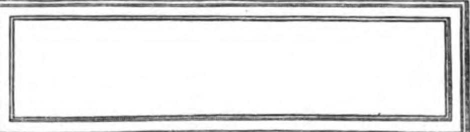

UC-NRLF
B 3 778 060


SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
FIAT
LVX
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS



Biochemische Zeitschrift

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie

Herausgegeben von

F. Hofmeister-Würzburg, C. von Noorden-Frankfurt a. M., E. Salkowski-Berlin, A. von Wassermann-Berlin

unter Mitwirkung von

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin

Hundertdreiundzwanzigster Band



Berlin
Verlag von Julius Springer
1921



Druck der Spamerschen Buchdruckerei in Leipzig

Inhaltsverzeichnis.

Biochemische Zeitschrift

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie

Herausgegeben von

F. Hofmeister-Würzburg, C. von Noorden-Frankfurt a. M.,
E. Salkowski-Berlin, A. von Wassermann-Berlin

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin

Hundertdreiundzwanzigster Band

Erstes bis viertes Heft

Ausgegeben am 25. Oktober 1921



Berlin
Verlag von Julius Springer
1921

Die **Biochemische Zeitschrift**

erscheint in zwanglosen Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band. Der Preis eines jeden Bandes beträgt M. 64.—. Die Biochemische Zeitschrift ist durch jede Buchhandlung sowie durch die unterzeichnete Verlagsbuchhandlung zu beziehen.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als 1½ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Mitteilungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens 2 Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Redakteur,
Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hittorfstr. 18,
zu richten.

Die Verfasser erhalten 60 Sonderabdrücke ihrer Abhandlungen kostenfrei, weitere gegen Berechnung. Für den 16 seitigen Druckbogen wird ein Honorar von M. 40.— gezahlt.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer
Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

123. Band. **Inhaltsverzeichnis.** Heft 1/4.

Die Einwirkung einiger Elektrolyte und Anelektrolyte auf die Senkungsgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen des Pferdes.

Von

J. Runnström.

(Zootomisches Institut Stockholm.)

(Eingegangen am 8. Juli 1921.)

Abkürzungen: Aggl. = Agglutination, K. = Kontrolle, R. = rote Blutkörperchen, Sed. = Sedimentierung, S.G. = Sedimentierungsgeschwindigkeit, St. = Stunde.

Die wichtigen Untersuchungen von Fåhræus[1]) haben die Aufmerksamkeit auf die Tatsache gelenkt, daß die Stabilität der R. bei der Schwangerschaft und bei verschiedenen pathologischen Zuständen vermindert wird. Fåhræus bestimmt die Stabilität der R., indem er nach gewissen Zeiten die Höhe der Schicht von R.-freiem Plasma oder Serum mißt, die sich bei der Sed. der R. bildet. Den Arbeiten Fåhræus gesellen sich schon eine Reihe von Veröffentlichungen von Linzenmeyer[2]), Kürten[3]), Abderhalden[4]) usw. bei. In einer umfangreichen Arbeit hat Fåhræus[5]) neuerdings auf vielseitigste Weise das Problem der Suspensionsstabilität des Blutes beleuchtet. Man findet hier auch eine eingehende Berücksichtigung der älteren Literatur.

Von der Arbeit Fåhræus angeregt, habe ich mir die Aufgabe gestellt, den Einfluß verschiedener Elektrolyte und den der Narkotica auf die Sed. der R. zu studieren.

Meinem Freunde, Dr. Fåhræus, sage ich meinen herzlichsten Dank wegen vielfacher Anregungen bei gemeinsamen Überlegungen. Ich habe auch den Vorteil gehabt, der Entwicklung der Arbeit Fåhræus sozusagen Stufe für Stufe folgen zu dürfen. Die Planlegung meiner Untersuchung wurde vor allem von der Hoffnung geleitet, zur Kenntnis der Eigenschaften der

---

[1]) Hygiea 1918; diese Zeitschr. **89**. 1918. Vortrag Tagung d. Dtsch. Physiol. Ges. 1920.

[2]) Pflügers Arch f. d. ges. Physiol. **181**, 169. 1920 u. **186**, 272. 1921.

[3]) Pflügers Arch f. d. ges. Physiol. **185**, 248. 1920.

[4]) Fermentforschung **4**, 230. 1921.

[5]) The Suspension Stability of the Blood. Acta medica **55**. 1921.

Oberflächenschicht der Zelle einen Beitrag geben zu können. Die Untersuchung über den Einfluß der Narkotica wurde schon im Jahre 1918 im Seruminstitut des dänischen Staates beinahe zu Ende geführt. Hier wurden auch im selben Jahre die Beobachtungen über den Einfluß der Elektrolyte angefangen. Ich benutze die Gelegenheit, dem Direktor des Instituts, Dr. Th. Madsen, meinen herzlichen Dank zu sagen. Die Untersuchungen wurden an der physiologisch-chemischen Abteilung des Karolinischen Instituts Stockholm fortgesetzt. Dem Direktor der Abteilung, Professor Dr. Sjöquist, sowie Dr. E. Hammarsten danke ich wegen ihrer freundlichen Unterstützung meiner Arbeit. Dem Chef der staatsmedizinischen Anstalt in Stockholm, Dr. C. Kling, bin ich auch zu Dank verpflichtet.

Bei den Untersuchungen wurde fast durchweg defibriniertes Pferdeblut verwendet. Das Serum wurde abzentrifugiert und die R. 2 mal mit 0,9 proz. NaCl- oder gewöhnlich mit Ringerlösung (NaCl) 0,9%, KCl 0,02%, $CaCl_2$ 0,02%, $NaHCO_3$ 0,01%) gewaschen. Für besondere Zwecke wurde auch in isotonischer Rohrzucker- oder Mannitlösung gewaschen.

Im folgenden wird der Ausdruck Flockung sowohl die Geldrollenbildung als die stärkere mehr unregelmäßige Flockung bezeichnen. Der Ausdruck „Agglutination" (Aggl.) wird dagegen nur in der Bedeutung starker Flockung benutzt. Damit wird aber kein prinzipieller Unterschied zwischen Geldrollenbildung und Aggl. gezogen.

I. Einfluß der Ionenreihen auf die Sedimentierung der roten Blutkörperchen.

Radsma[1]) hat schon den Einfluß verschiedener Ionen auf die Aggl. der R. in Glucose untersucht. Die Salzkonz. sowie die Menge der zugesetzten R. waren sehr klein. Er hat dabei die folgenden Reihen gefunden:

$$Cl > NO_3,\ Br > J > SCN \text{ und } K > Na > Li\ .$$

Bei der Versuchsanordnung Radsmas habe ich bei den R. des Pferdes keine gut reproduzierbaren Ergebnisse erhalten. Die von Radsma angegebene Reihe ist aber mehrmals hervorgetreten. Im folgenden gebe ich eine Übersicht meiner Resultate.

In einer Mischung 3 ccm 1 proz. Gelatine in 5,3% Mannit + 1,75 ccm 5,3% Mannit + 0,25 ccm Salzlösung + 1 ccm R. (mannitgewaschen) tritt Aggl. nach der Reihe (K-Salze) ein:

(1) $$SCN > J > NO_3 > Br > Cl > SO_4\ .$$

Nach 1 Minute ist in einem Versuch die Höhe der Bodenschicht von agglutinierten Blutkörperchen in Millimetern die folgende gewesen:

13, 10, 8, 3, 0, 0.

[1]) Diese Zeitschr. 89. 1918.

Es liegt also im Vergleich mit den Versuchen **Radsmas** eine Umkehrung der Reihe vor. Bisweilen fällt aber SO_4 aus der Reihe heraus. Die Aggl. ist dabei ebenso stark wie in SCN oder NO_3. Bei einer Senkung des Gelatinegehaltes auf ein Drittel ist eine Umkehrung der Ionenreihe eingetreten. Die Aggl. ist am stärksten in SO_4 und Cl, am geringsten in SCN gewesen.

Die starke Aggl. in den angeführten Versuchen ist vor allem als eine Wirkung der Gelatine zu betrachten. Die aggl. Wirkung ist schon von verschiedenen Forschern beobachtet worden[1]). Unser Versuch lehrt aber, daß die Wirkung der Gelatine in salzarmen Lösungen viel stärker als in salzreicheren ist. Gelatine derselben Konz. in 0,9 proz. NaCl- oder Ringerlösung hat nicht so starke Wirkung wie bei den oben angegebenen Salzkonz. Dasselbe gilt auch von anderen die Sed. der R. befördernden organischen Kolloiden, auch von dem Serum; 1 ccm Serum + 4 ccm Mannit hat z. B. eine stärkere Wirkung als 3 ccm Serum + 2 ccm Ringerlösung.

Die Sed. der R. wurde in der folgenden Mischung gemessen: 3 ccm 1 proz. Gelatine in 5,3% Mannit + 1 ccm 5,3% Mannit + 1 ccm isot. Salzlösung + 1 ccm R.:

(2)		K_2SO_4	KCl	KBr	KNO_3	KJ	KSCN	$CaCl_2$
	42′	24	65	84	69	83	59	86

Die Zahlen geben hier nach dem Vorgange von **Fåhræus** die Höhe der R.-freien Schicht wieder.

Durch Zusatz von 0,4 ccm $^n/_{20}$-HCl zu jeder Röhre beschleunigt man die Flockung der R. und man kann nun wiederum die Reihe

$$SCN > J > NO_3 > Br > Cl > SO_4$$

finden.

Erhöht man den Salzgehalt noch weiter, findet man bei Zusatz von HCl nicht mehr diese Reihe, die deutlicherweise nur bei sehr instabilen Suspensionen zur Geltung kommt, vgl. unten.

Die Sed. wurde in gelatinehaltigen isotonischen Salzlösungen (K-Salzen) untersucht. Es wurde sehr konstant eine Reihe gefunden, die von folgendem Versuche veranschaulicht wird:

5 ccm isotonischer Salzlösung mit 0,2% Gelatine + 1 ccm R.

(3)		SO_4	Cl	Br	NO_3	J	SCN
	20′	38	49	68	45	11	1

[1]) Vgl. **Landsteiner**, Handbuch der Biochemie, Bd. II, S. 399.

Auffallend ist die starke Stabilisierung in KSCN. Am stärksten ist die Sed. in Br.

Bei Senkung des Salzgehaltes wird die Reihenfolge etwas verändert, wie durch einen Vergleich mit Tabelle (2) hervorgeht. Die relative S.G. nimmt in KNO_3, KJ und KSCN zu, in SO_4 dagegen ab.

Wir führen noch den folgenden Versuch an:

2 $^1/_3$ ccm isotonischer Mannit- + 2 $^2/_3$ ccm isotonischer Salzlösung, Konz. der Gelatine 0,54% + 1 ccm R.

(4)		SO_4	Cl	Br	NO_3	J	SCN
	25′	25	52,5	64	62	60	21,5

Eine ähnliche Wirkung wie durch Senkung des Salzgehaltes erhält man durch Zusatz von HCl.

5 ccm isotonische Salzlösung mit 0,2% Gelatine + 1 ccm R. + 0,4 ccm $^n/_{20}$-HCl.

(5)		SO_4	Cl	Br	NO_3	J	SCN
	30′	30	65	69	45	68	10

Etwa dieselbe Anionenreihe wie in den Versuchen mit Gelatine-Salzlösungen wurde auch in Versuchen gefunden, bei denen 2 ccm isot. Salzlösung zu 3 ccm Serum + 1 ccm R. gesetzt wurden:

(6)		SO_4	Cl	Br	NO_3	J	SCN
	20′	51	69	71	48	41	9

Am auffallendsten ist wiederum die Wirkung von SCN. Variationen in der Reihenfolge kommen aber vor. Es ist nicht ohne Interesse zu konstatieren, daß die beobachteten Abweichungen in dieselbe Richtung gehen wie bei der Senkung des Salzgehaltes in den Gelatineversuchen, d. h. die relative S.G. in SCN, J und NO_3 nimmt zu. Wir führen folgendes Beispiel an:

(7)		SO_4	Cl	Br	NO_3	J	SCN
	21′	58	81	81	79	89	29

Wahrscheinlich können physiologische und pathologische Variationen des Serums auf die Salzreihen einwirken (zu den Versuchen wurde das Blut von verschiedenen Pferden verwendet, u. a. von solchen, die zur Herstellung von Antidiphtherie- oder Antitetanusserum benutzt wurden).

Zusatz von HCl zu der Serum-Salzmischung wirkt etwa wie in den Gelatineversuchen. Unten wird die Sed. nach 30 Minuten in 3 Serum- + 2 isot. Salzl. (obere Reihe) + 1 ccm R. und in derselben Mischung + 0.5 ccm $^n/_{10}$-HCl (untere Reihe) angegeben:

(8)	SO_4	Cl	Br	NO_3	J	SCN
	15	19,5	20	20	17	5,5
	10,5	12,5	15	17	19	9

Es ist zu berücksichtigen, daß durch den Zusatz von 0,5 ccm HCl eine Verdünnung des Serums eintritt, die an und für sich schon stabilisierend wirkt. Die S.G. ist in SO_4, Cl, Br vermindert, in NO_3 fast unverändert und in J und SCN beschleunigt.

Bei Zusatz von 0,9 ccm $^n/_{10}$-HCl zu je 5 ccm der Mischungen ist eine weitere Verschiebung eingetreten:

(9)	SO_4	Cl	Br	NO_3	J	SCN
2 St.	33	31	36	42	50	39

Einleitung von CO_2 wirkt auf dieselbe Weise wie der Zusatz von HCl.

Die Wirkung von HCl wird noch von den beiden folgenden Versuchen beleuchtet:

3 ccm Serum + 2 ccm NaCl + 1 ccm R.

(10)	K	0,2	0,3	0,4	$^n/_{10}$-HCl
1 St. 30′	70	67	60	59	

3 ccm Serum + 2 KSCN + 1 ccm R.

(11)	K	0,1	0,2	0.3	0,4	$^n/_{10}$-HCl
1 St. 9′	24	24	25,5	31,5	37	
18 St.	69	70	77,5	86,5	90,5	

In (10) Verminderung, in (11) Beschleunigung der S.G. als Folge des HCl-Zusatzes. Ähnliche Resultate wurden in Gelatinelösungen erreicht.

In den reinen Salzlösungen (5 ccm isot. Salzl. + 1 ccm R.), wo die Stabilität bekanntlich sehr groß ist, erkennt man etwa dieselbe Reihenfolge wie in Gelatinesalzlösung:

(12)	SO_4	Cl	Br	NO_3	J	SCN
12 St.	29,5	35,5	30	30	23	17,5

Folgender Versuch gibt ein Beispiel der Resultate in einer Mischung 4 ccm Mannit + 1 ccm isot. Salzlösung + 1 ccm R.:

(13)	SO_4	Cl	Br	NO_3	J	SCN
14 St.	33	93,5	89	87	54	30

Die S.G. ist bei dem niedrigeren Salzgehalt größer als bei dem höheren, besonders wenn man berücksichtigt, daß das spez. Gewicht der Suspensionsflüssigkeit in dem ersten Falle größer als in dem letztgenannten ist.

Die Reihenfolge stimmt in (13) besser mit dem Versuch mit Gelatine in reiner isot. Salzlösung (3) als mit dem, wo die Gelatine

in der Mischung 4 ccm Mannit + 1 ccm isot. Salzlösung (2) gelöst wurde. Man kann sagen, daß Zusatz von Gelatine zu der Salzlösung ungefähr wie eine Senkung des Salzgehaltes wirkt.

In einigen anderen Versuchsreihen wurden die Na-Salze noch einiger Anionen in ihrer Einwirkung auf die Sed. geprüft:

4 ccm 10 proz. Rohrzuckerlösung + 1 ccm isotonischer Salzlösung, Gelatine etwa in der Konzentration 0,2 % zugefügt + 1 ccm R.

(14)	Citrat	SO_4	C_2O_4	$C_2O_2H_3$	Cl	CrO_4
	11,5	12	6	70	87	10

Während die Sed. in der Acetat- und Chloridlösung schnell geht, findet man bei den übrigen Anionen eine beträchtliche Stabilisierung. Die Reihenfolge zwischen Cl und $C_2O_2H_3$ ist in einigen Fällen die umgekehrte gewesen. Der Unterschied zwischen der Wirkung der beiden Ionen ist aber nicht groß.

Bei Versuchen mit 5 ccm isot. Salzl. mit 0,2% Gelatine + 1 ccm R. findet man immer eine größere S.G. in Acetat und Chlorid im Vergleich mit SO_4 oder Citrat; das Citrat wirkt hier aber viel weniger stabilisierend als das Sulfat:

(15)	Citrat	SO_4	$C_2O_2H_3$	Cl
	49	3	70	62

Es besteht kein großer Unterschied zwischen den Wirkungen der Kalium- und Natriumsalze. Dagegen verhalten sich Ca- und Ba-Salze auf eine abweichende Weise. Im großen und ganzen darf man wohl sagen, daß in den Lösungen dieser Salze die Suspensionen der R. instabiler als in den Lösungen von K- und Na-Salzen sind.

In Versuchen mit kleineren Salzgehalten [0,25 ccm + 4,75 ccm Gelatinemannitlösung, vgl. (1) S. 2] ist im allgemeinen die Aggl. früher in $CaCl_2$ und $BaCl_2$ als in KCl eingetreten (Ba > Ca). Aus Versuch (2), S. 3, geht es hervor, daß auch bei Erhöhung des Salzgehaltes (1 ccm isot. Salzl. + 4 ccm Mannit) Ca > K. In einem Versuch $2^2/_3$ ccm isot. Salzlösung + $2^1/_3$ ccm Mannit, 0,54% Gelatine + 1 ccm R.:

(16)		KCl	$CaCl_2$
	25′	52,5	81

In 5 ccm isot. Salzlösung, Gelatine 0,5—1% ist dagegen die Suspension der R. etwas stabiler in $CaCl_2$ als in KCl. In 3 ccm Serum + 2 ccm isot. Salzlösung + 1 ccm R. liest man bei den

zweiwertigen Kationen eine ganz beträchtlich geringere Sed. als bei den einwertigen ab.

(17)		KCl	NaCl	$CaCl_2$	$BaCl_2$
	50′	68	58	20	18

In Ca und Ba ist hier die Geldrollenbildung schwächer als in K und Na; in den erstgenannten sind die R. eher glockenförmig als bikonkav, die Flockung mehr unregelmäßig.

In 4 ccm Mannit + 1 ccm isot. Salzlösung (ohne Gelatine) + 1 ccm R. ist die Sed. in Ca > Na, K:

(18)		NaCl	$CaCl_2$
	18 St.	22	38,5

In isotonischen $CaCl_2$- und $BaCl_2$-Lösungen (5 ccm Salzl. + 1 ccm R.) tritt keine stärkere Sed. in Vergleich mit den NaCl- und KCl-Lösungen hervor. Bei mikroskopischer Beobachtung findet man aber, daß in Ba Aggl. auf dem Objektträger eintritt. (19) Nach Erwärmung auf 37° z. B. 12 St. tritt starke Aggl. in $CaCl_2$, dagegen nicht in NaCl-, KCl- oder Ringerlösung ein. Hier ist im Gegenteil die von Fåhræus[1]) entdeckte interessante Stabilisierung der R. eingetreten. In 3 ccm Serum + 2 ccm NaCl + 1 ccm R. ist Hämolyse der $CaCl_2$-vorbehandelten R. eingetreten. Ringer- und NaCl-R. aus 37° zeigen nach 33 Minuten eine Sed. von 15, während die K., nichtgewärmte R., schon die Sed. 98 erreicht haben.

Noch einige Erfahrungen bezüglich der Wirkung der Erwärmung von R. seien hier mitgeteilt.

Erwärmung in Rohrzuckerlösung wirkt nicht stabilisierend. Solche R. zeigen im Gegenteil in 3 ccm Serum + 2 NaCl geschwemmt eine schnellere Sed. als die K. auf.

In 4 ccm Rohrzucker + 1 ccm Ringerlösung tritt dagegen die Stabilisierung ein und ist hier stärker als bei höherem Salzgehalt der Suspensionsflüssigkeit. Die Stabilität der vorbehandelten R. wurde in 3 ccm Serum + 2 ccm NaCl + 1 ccm R. beobachtet. Die folgenden Zahlen geben die Sed. in 3 ccm Serum + 2 ccm NaCl nach Vorbehandlung während 12 St. bzw. mit

(20)				
	1 ccm Ringerlösung	+ 4 ccm Rohrzuckerlösung	10
	2 „ „	„ 3 „ „	11
	4 „ „	„ 1 „ „	38
	5 „ „	„ 0 „ „	55

Die Schwermetallsalze bzw. die Salze der seltenen Erden bewirken bekanntlich auch in relativ niedrigen Konz. die Aggl. der R.

---

[1]) Hamburger Vortrag 1920. Suspension stability of the blood. Part IV.

Ich führe hier nur einige Ergebnisse meiner Studien über die Einwirkung der Schwermetallsalze an. Bei Zusatz von $CdCl_2$ und in etwas weniger ausgesprochenem Maße von $ZnSO_4$ zu 3 ccm Serum + 2 ccm NaCl (1 ccm R.) beobachtet man zuerst eine Zone schwach gesteigerter S.G. (bei $CdCl_2$ 0,02—0,2 Millimol); dann folgt ein Konzentrationsbereich ($CdCl_2$ 0,4—2,8 Millimol) von ausgesprochen stabilisierender Wirkung (Sed. z. B. in K. 50, in 1 Millimol $CdCl_2$ 7); das stabilisierende Bereich erstreckt sich bei $CdCl_2$ ungefähr von 0,4—3 Millimol. Bei noch höherer Konzentration tritt die starke Aggl. ein. In $ZnSO_4$ ist die Stabilisierung weder so stark (höchstens 1 : 2), noch streckt sich dieselbe über ein so großes Konzentrationsbereich (etwa 0,6—1,5 Millimol); die starke Aggl. tritt hier etwa bei 2 Millimol ein. Eine noch weniger ausgesprochene stabilisierende Zone darf man vielleicht auch $FeCl_3$ zuschreiben.

Wenn man die Wirkung der Schwermetallsalze in NaCl- und in Mannitlösung vergleicht, findet man eine ungleich viel stärkere aggl. Wirkung in der letztgenannten Lösung. Arrhenius[1]) bemerkt schon, daß NaCl die Aggl. durch Schwermetallsalze hindert. Zu je 5 ccm 0,02 Millimol $CdCl_2$ enthaltende 5,3 proz. Mannit- und 5 ccm 0,9 proz. NaCl-Lösung und 5 ccm Mischungen von diesen 0,05 ccm R. In Mannit nach 2′ eintretende Flockung. Mit steigendem NaCl-Gehalt Steigerung der Stabilität (in 3 NaCl + 2 Mannit z. B. erst nach 20′ feine Flockung). Werden die in Mannit gewaschenen R. während etwa 48 St. in Mannit aufbewahrt, ändert sich das Verhalten der R. auf eine radikale Weise. Nun tritt bald in dem geschilderten Versuche eine grobe Flockung bei den höheren NaCl-Konzentrationen ein; in Mannit und den 0,2—0,5 ccm NaCl enthaltenden Mischungen ist dagegen die Aggl. verzögert (ist z. B. in einem Versuche erst nach 40′ eingetreten). Eine ähnliche Beobachtung wie die soeben geschilderte ist von Kürten (l. c. oben S. 1) erwähnt worden.

II. Einfluß der Salze auf die Säureagglutination der roten Blutkörperchen.

Es ist oben erwähnt worden, daß die flockende Wirkung der Kolloide (Gelatine, Serum) bei Abnahme des Salzgehaltes der Suspensionsflüssigkeit wächst. Dasselbe gilt, wie erwähnt, auch für die flockende Wirkung der Schwermetallsalze. Ein ähnliches Verhältnis findet man bei der Flockung durch Säure, wie schon Rohonyi[2]) beiläufig erwähnt hat.

Wir haben vor allem die Einwirkung von NaCl untersucht. Verschiedene Mischungen von isotonischer Rohrzucker- und NaCl-Lösung wurden hergestellt, zu je 5 ccm der Mischungen wurden 0,2 ccm $^{n}/_{10}$-$NaHCO_3$ und wechselnde Mengen $^{n}/_{20}$-HCl gesetzt; p_H wurde elektrometrisch bestimmt. In jede Röhre wurde dann 1 ccm gewaschener R. gesetzt. Die Aggl. wurde an ausgenommenen Proben mikroskopisch beobachtet.

[1]) Meddel. K. Vetensk.-Akad. s. Nobelinst. **1**. 1909.

[2]) Kolloidchem. Beih. **8**, 337. 1916.

Die [H.], bei der die geflockten R. mittels Druck des Deckglases spindelförmig ausgezogen werden konnten, wurde als die agglutinierende betrachtet.

(1)					
	0,9% NaCl	5	3	1	0,5 ccm
	10% Rohrzucker. .	0	2	4	4,5 „
	p_H bei der Aggl.. .	2,76	2,925	3,21	3,91 „

Dieselbe Gesetzmäßigkeit wurde bei Gelatinezusatz beobachtet

In einem Versuche mit 0,1% Gelatine in NaCl-Mannitmischungen wurde die Aggl. bei Zufügung der folgenden HCl-Mengen beobachtet:

(2)					
	0,9% NaCl	4	2	1	0,25 ccm
	5,3% Mannit	1	3	4	4,75 „
	n/20-HCl	0,5	0,4	0,3	0,2 „

Der p_H-Wert der Aggl. ist verschieden bei Zusatz von Gelatine und ohne diesen Zusatz.

4 ccm NaCl + 1 ccm Rohrzucker + Gelatine + HCl + 1 ccm R.

(3)				
	% Gelatine. . . .	0,6	0,4	0
	p_H bei der Aggl. .	3,93	3,345	2,86

Gelatinezusatz bringt die R. der Aggl. näher. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß die Geldrollenbildung, die schon in den Gelatinelösungen stattfindet, nur dem Grade nach von der Aggl. durch Säure verschieden ist. Vielleicht muß man doch bei dem letztangeführten Versuche berücksichtigen, daß die Gelatinelösung durch den Säurezusatz verändert wird, Veränderungen, die eine Verstärkung der Flockung möglicherweise herbeiführen könnten.

Bei der hier angewendeten R.-Konzentration ist bei Anwesenheit der Salze der einwertigen Kationen keine nach 2 Seiten begrenzte Flockungszone bei Zusatz von HCl vorhanden. Bei Erhöhung der [H.] über die eben agglutinierende tritt nur eine Verstärkung der Aggl. und Hämolyse ein. In $BaCl_2$ und $CaCl_2$ zeigen die R. dagegen eine allerdings nicht sehr scharf abgegrenzte Zone maximaler Flockung. Sowohl bei Senkung als Erhöhung der [H˙] tritt Stabilisierung ein.

III. Sedimentierungsgeschwindigkeit und Resistenz der Blutkörper.

Es hat sich herausgestellt, daß eine auffallende Übereinstimmung zwischen der S.G. und der Hämolyse der R. durch starke Hypotonie besteht. Je schneller die Sed., desto geringer ist die Resistenz. Die R. (0,2—0,6 ccm) wurden in 5 ccm Salz-

lösung von $\Delta = 0{,}28^\circ$ geschwemmt. In den Salzlösungen wurde etwas Gelatine (1%) gelöst, die als Puffer dient.

Hämolyse:

(1)	KBr	$> KCl$	$> KNO_3 > KJ$	$> KSCN > K_2SO_4$
	vollst. nach 2–3′	vollst. nach 5–7′	20 St. etwa 70%	20 St. < 50%

Die anfangende Hämolyse ist in NO_3 und J zum erstenmal nach 55 Minuten, in SCN und SO_4 nach 2 St. notiert worden.

Die höhere Resistenz in SO_4 als in Cl ist schon seit den Untersuchungen Willerdings[1]) ein bekanntes Verhältnis.

Ganz dieselbe Reihenfolge wie die oben angegebene findet man in den Salzlösungen ohne Gelatine; die Hämolyse geht hier etwas langsamer als bei Gelatinezusatz.

Die colorimetrische Verfolgung der Hämolyse wurde bisweilen durch Zählung der Blutkörperchen nach einer gewissen Zeit in einer Zählkammer kontrolliert. Es wurde z. B. in einem Versuch mit Salzlösungen ohne Gelatine gefunden, daß die KSCN-Lösung nach 25 Minuten rund 3mal so viele Blutkörperchen wie die KBr-Lösung nach 8 Min. enthielt.

Bei schwächerer Hypotonie als die in den angeführten Versuchen herrschende ist die Reihenfolge bei der Hämolyse eine andere. In Salzlösungen von $\Delta = 0{,}45$

(2) $SCn > J > NO_3, Br > SO_4 > Cl$ (2—3 Tage im Eisschrank).

Diese Reihe stimmt gut mit derjenigen, die Höber[2]) bei derselben Versuchsanordnung bei Rinderblutkörperchen erhalten hat.

Von Na-Salzen wurde die Wirkung hypotonischer ($\Delta = 0{,}28$), Acetat- und SO_4-Lösung mit 1% Gelatine) geprüft. Die Reihe ist hier:

(3) $$\text{Acetat} > Cl \gtrless SO_4 .$$

Die Kationen ordnen sich bei der Hämolyse durch starke Hypotonie in der Reihe: $Ba > Ca > Mg > K$.

Ähnliche Salzreihen wurden bei Hämolyse durch NH_4Cl beobachtet.

2 ccm 0,9 proz. NH_4Cl mit 1% Gelatine + 3 ccm isotonischer Salzlösung + 0,5 ccm R., Hämolyse:

(4)	KBr	$> KCl$	$> NO_3 > J$	$> SCN > SO_4$
	vollst. nach 25′	80% nach 42′	sichtbar nach 85′	20 St. schwach

---

[1]) Inaug.-Diss. Gießen 1897.

[2]) Diese Zeitschr. **14**, 209. 1908.

(5)	$BaCl_2$	> $CaCl_2$	> KCl	> NaCl
	vollst. nach	vollst. nach	85% nach	75% nach
	17′	32′	65′	65′

Die angeführten Versuche (4) und (5) mit An- und Kationen sind mit Blut von 2 verschiedenen Aderlässen gemacht.

Versuch mit Na-Salzen 4 ccm isotonische Salzlösung mit Gelatine + 2 ccm NH_4Cl + 0,2 ccm R.

(6)	Acetat	> Cl	> SO_4, Citrat
	vollst. nach 5′	1 St. 70%	20 St. keine Hämolyse.

Auch in Oxalatlösung geht die Hämolyse bei derselben Versuchsanordnung sehr langsam.

Zu den mitgeteilten Versuchen ist zu bemerken, daß die R. in SO_4 resistenter sind, als bei vollkommenem Parallelismus von Hämolyse und S.G. zu erwarten wäre; Acetat gibt im Verhältnis zu Cl eine geringere Resistenz als zu erwarten.

Die Erwärmung der Blutkörperchen bei 37° stabilisiert, wie schon erwähnt, nach Fåhræus höchst bedeutend, vgl. I (19), S. 7. Ebenso ist die Hämolyse durch Hypotonie und durch Zusatz von NH_4Cl stark verzögert.

(7) Blutkörperchen wurden in Ringer- und NaCl-Lösung bei 37° 12 St. (ohne Schütteln) gehalten. Die Hämolyse der abzentrifugierten und in 0,45 proz. NaCl geschwemmten Blutkörperchen wurde mit der Hämolyse in 0,45 proz. NaCl der im Eisschrank aufbewahrten Blutkörperchen von demselben Aderlasse verglichen. Bei den letztgenannten nach 5 Min. 30 Sek. vollständige Hämolyse; nach 70 Min. war die Hämolyse bei den wärmebehandelten Blutkörperchen noch nicht vollständig.

(8) In einem ähnlichen Versuche wurden die Blutkörperchen in 0,95 proz. KBr ($\Delta = 0{,}28$) geschwemmt. Nach 30 Min. K., nach 45 Min. die wärmebehandelten Blutkörperchen gezählt (je 30 Felder der Zählkammer). Mittel im ersten Falle 3, im zweiten 51.

Nach Brinkman und van Damm[1]) sind die Blutkörperchen in einer equilibrierten Salzlösung resistenter gegen Hypotonie als in Serum. Ich habe dieselbe Erfahrung wie die zitierten Verfasser mehrfach gemacht.

(9) Im Gegensatz zu diesen bin ich der Ansicht, daß auch Gelatine die Resistenz erniedrigt; 0,2 ccm R. in 5 ccm 0,6 proz. NaCl- und in 0,6 proz.

---

[1]) Diese Zeitschr. **108**, 35. 1920.

NaCl-Lösung mit 0,5% Gelatine. Nach 4 St. 30′ 0,5 ccm der geschüttelten Suspensionen in 5 ccm isotonischer K_2SO_4. Je 100 Felder einer Zählkammer ergab das Verhältnis $\frac{8,7}{4,1}$ zwischen der Zahl der R. in den beiden Fällen. In einem Versuch wurde 0,2 ccm $NaHCO_3$ sowohl zu der Salz- wie zu der Gelatine-Salzlösung gesetzt. Das Verhältnis war hier sehr nahe $\frac{2}{1}$. Nun ist es zuzugeben, daß die angewendete Gelatine trotz mehrwöchentlicher Waschung noch Spuren von Ca enthielt. Bei der NaCl-Konzentration 0,6% beschleunigt aber Zusatz von 0,008—0,025% $CaCl_2$ die Hämolyse nicht.

Bei niederer NaCl-Konzentration (z. B. 0,45%) wirken dagegen diese $CaCl_2$-Konzentrationen schon beschleunigend.

IV. Besprechung der Ergebnisse über Elektrolyteneinwirkung.

Die Wirkungen der Elektrolyte auf die Stabilität der R. sind vielleicht am besten auf Grund der elektrischen Theorie der Aggl. verständlich. Die Ladung der R. ist demnach in elektrolytarmen Lösungen schwach, dieselbe nimmt aber mit dem Gehalt der Lösung an Alkalisalzen zu. Auf diese Weise können die Beobachtungen Rohonyis[1]), Radsmas[2]) und unsere oben mitgeteilten Versuche über die Wirkung der [H˙] auf die Aggl. der R. in verschiedenen NaCl-Konzentrationen gedeutet werden.

Zur Erklärung der Wirkungen der Alkalisalze auf die Stabilität der R. liegen 2 Möglichkeiten vor. Die R. sind permeabel für die Anionen, nicht aber für die Kationen der untersuchten Elektrolyte. Es entsteht hierdurch eine elektrische Doppelschicht in der Zellenoberfläche. Die Anionenpermeabilität ist ja durch zahlreiche Untersuchungen (vgl. Höber, Physikalische Chemie der Zelle usw., 4. Aufl. S. 603—605) wahrscheinlich gemacht. Besonders nach CO_2-Einleitung soll die Anionenpermeabilität erhöht sein. Bei der zweiten Erklärung (Rohonyi, l. c.) nimmt man eine Adsorption der Elektrolyte, speziell der Anionen, an die Oberfläche der R. an. Es scheint, daß die letztgenannte Annahme unsere Ergebnisse am besten unter einen Gesichtspunkt bringen. Die folgenden Überlegungen beanspruchen nur einen Beitrag zur Diskussion des Problems zu bringen; eine vollständige Theorie dürfte es noch unmöglich zu geben sein.

Die höhere Resistenz gegen H˙-Aggl. bei Erhöhung des NaCl-Gehaltes [Abt. II, Versuch (1)] hängt nach der Auffassung, der wir folgen, mit einer Erhöhung der negativen Ladung der R. durch Anionenadsorption zusammen.

Höber (zit. nach S. 601 Höber, Physikalische Chemie der Zelle usw., 4. Aufl.) hat gefunden, daß die R. in schwachen NaCl-Lösungen bei Einleitung von CO_2 umgeladen werden. Bei Erhöhung des Salzgehaltes (0,8% NaCl) tritt die Umladung nicht ein. Diese Tatsache stimmt prinzipiell mit unseren Ergebnissen über die Wirkung der [H˙] auf die Aggl. überein. Bei den höheren Salzkonzentrationen ist wahrscheinlich eine höhere [H˙] als bei den niederen zur Umladung der R. notwendig. Höber hat die Anionen-

[1]) Kolloidchem. Beih. 8, 337. 1916.
[2]) Diese Zeitschr. 89. 1918.

permeabilität als Erklärung des Verhaltens der R. herangezogen. Die Erscheinung wird aber einfacher erklärt, wenn man die negative Ladung der R. als Folge einer Anionenadsorption betrachtet. Bei Erhöhung der NaCl-Konzentration wird die Ladung der R. erhöht.

Eine sehr auffallende Ähnlichkeit mit dem Verhalten der R. zeigt nach den Untersuchungen von Michaelis und Rona[1]) die Wirkung fremder Elektrolyte auf die Flockung von hitzedenaturiertem Serumalbumin durch $H^{\cdot}$. Die $[H^{\cdot}]$ der Flockung kann durch Salzzusätze verschoben werden. Alle Anionen, die überhaupt verschieben, erhöhen die $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration bei der die optimale Flockung eintritt, vgl. die Einwirkung von NaCl auf die Säureaggl. der R.

Verschiedene Anionen haben nach Michaelis und Rona eine verschiedene Wirkung auf die Lage des Flockungsoptimums des hitzedenaturierten Serumalbumins; man findet die Reihe: $Cl < Br$, $ClO_3 < J$, $NO_3 < CNS$. Ich habe bei R. Versuche auch mit KSCN ausgeführt. Wenn ich von den salzärmeren Mischungen absehe, ist die Aggl. bei derselben HCl-Zusatz wie in NaCl-Versuchen schwächer geworden.

Die soeben angegebene Anionenreihe aus den Versuchen von Rona und Michaelis stimmt sehr gut mit den Reihen, die dieselben Verfasser (ib.) bei Versuchen über die Adsorption von Elektrolyten durch Kohle gefunden haben. Sie geben hier für die Anionen die folgende Reihe an:

$$SO_4 < HPO_4 < Cl < Br < NO_3 < J < CNS < OH.$$

Wenn die Anionenpermeabilität für die Stabilität der R. verantwortlich wäre, sollte man einen Parallelismus zwischen der Permeabilität und der stabilisierenden Wirkung der Ionen finden.

Ege[2]) hat neuerdings die Permeabilität verschiedener NH_4-Salze untersucht. Bezüglich der Eindringungsgeschwindigkeit verschiedener Anionen kommt er (S. 165) zu dem folgenden durch relative Zahlen ausgedrückten Resultate: SO_4'' 1, $(COO)_2''$ 2,5, CrO_4'' 10,8, NO_3' 10,5, Br' 13,5, HCO_3' 20, Cl' 30. $CH_3COO' > Cl$, Tartrat- und Citrationen dringen überhaupt nicht ein. Leider fehlen hier mehrere für einen Vergleich mit unseren Resultaten wichtige Ionen. Man findet jedoch, daß die Permeabilität und die stabilisierende Wirkung gar nicht parallel gehen, eher herrscht zwischen beiden ein umgekehrtes Verhältnis. Die Anionen stabilisieren in den salzreicheren Lösungen etwa nach der Reihe: $SCN > J > NO_3 > Cl > Br$, Acetat [I (3), (15)]. Für die Permeabilität findet man nach den angeführten Ergebnissen Eges die Reihe: Acetat $> Cl > Br > NO_3$. SO_4, $(COO)_2$, Citrat (und nach einigen Versuchen) auch Tartrat, die nicht oder sehr langsam eindringen, wirken auch stabilisierend [I (14)] [bei höherem Salzgehalt tritt in Citrat eine relativ stärkere S.G. ein I (15)]; CrO_4 dringt nach Ege 10 mal schneller als SO_4 ein, hat aber etwa dieselbe stabilisierende Wirkung. Es wäre von Interesse, die Permeabilität der SCN- und J-Ionen zu kennen, von denen vor allem der erstgenannte eine so ausgeprägte Wirkung auf

[1]) Diese Zeitschr. **94**, 225. 1918.

[2]) Studier over Glukosens Fordeling ect. Disp. Köbenhavn 1919.

die S.G. hat. Jedenfalls haben sie nach unseren Versuchen eine stark hemmende Wirkung auf die Permeabilität für Wasser, vgl. III.

Wenn die Anionenpermeabilität für die Stabilisierung der R. verantwortlich ist, sollen Säuren eine stabilisierende Wirkung ausüben. Dies scheint nun in der Tat nach einigen Angaben von Linzenmeier[1]) (CO_2-Einleitung) und Fåhræus (Stability S. 151, Zusatz von H_2SO_4) zu sein. Einleitung von CO_2 in defibriniertes Ziegenblut wirkt nach eigener Erfahrung zu einem gewissen Grade stabilisierend. Nach 24 St. K. 7, CO_2-Blut 5,8 mm. In diesen Versuchen sind die Verhältnisse sehr kompliziert.

Die Wirkung des Zusatzes von HCl zu Gelatinelösung oder Serum ist durch die Versuche I (5), (8), (9), (10), (11) beleuchtet worden. Es geht aus diesen hervor, daß die R. bei der Gegenwart verschiedener Anionen ein verschiedenes Verhalten zeigen; in SO_4, Cl, Br tritt Stabilisierung, in J, SCN Beschleunigung der S.G. ein; in NO_3 ist die Veränderung gering. Die Verhältnisse können nicht durch die Anionenpermeabilität einheitlich erklärt werden.

Man findet eine nicht zu verkennende Übereinstimmung zwischen stabilisierender Wirkung und Adsorption der Anionen durch Kohle, wie diese durch die zitierte Untersuchung von Rona und Michaelis (l. c. oben S. 13) bekannt ist. Einige Divergenzen zwischen Adsorptions- und Stabilisierungsreihen sind doch vorhanden. In der letzteren hat SO_4 und überhaupt die zweiwertigen (und dreiwertigen: Citrat), soweit sie untersucht sind, eine andere Stellung als in der erstgenannten Reihe. Auf Grund der elektrischen Theorie der Flockung ist dies ja nicht schwer verständlich. Diese höherwertigen Anionen vermögen es der R.-Oberfläche eine relativ höhere Ladung zu geben, auch wenn sie weniger stark als die einwertigen adsorbiert werden. Die hohe Resistenz gegen Hypotonie und NH_4Cl-Wirkung in SO_4, Oxalat usw. deuten daraufhin, daß diese Ionen eine verdichtende Wirkung auf die R.-Oberfläche ausüben. Es ist wohl möglich, daß eine solche Veränderung sekundär auf das Potential der Oberfläche erhöhend wirken kann. Die unten mitgeteilten Versuche über die Wirkung der Narkotica geben ebenfalls zu dieser Vorstellung Veranlassung. Der Unterschied zwischen der S.G. in 4 ccm Mannit + 1 ccm KCl und in 4 ccm Mannit + 1 ccm KSCN ist sehr groß I (13). Werden die Suspensionen wiederholt aufgeschüttelt, gleicht sich der Unterschied in den beiden Salzen aus. Wahrscheinlich werden die R. auf eine solche Weise verändert, daß die Adsorption von SCN in der Oberflächenschicht allmählich schwächer wird.

S. Schou (unveröffentlicht) hat durch direkte Analysen gefunden, daß aus den Mischungen 4 ccm Mannit + 1 ccm KCl bzw. 4 ccm Mannit + 1 ccm KSCN etwas mehr SCN als Cl von den zugesetzten R. aufgenommen wird.

Rohonyi (l. c. oben S. 12) hat die Einwirkung verschiedener Anionen auf die Permeabilität der R. für $NaNO_3$ untersucht und findet dabei die Reihe:

$$SO_4 < Cl < J < NO_3 < \text{Oxalat} < SCN.$$

[1]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **186**, 272. 1921, vgl. S. 280.

Rohonyi deutet die Wirkung der Anionen als Folge einer Verdrängung der NO_3-Ionen von der Zelloberfläche.

Die verschiedenen Anionen haben auch eine verschiedene Wirkung auf die R.-Form; 0,5 ccm R. in 5 ccm Salzlösung; Untersuchung der Form auf in der Flamme entladenen Objektgläsern, vgl. Brinkman und v. Damm[1]), nach denen die Reibungselektrizität des Glases die Ursache der Entstehung der Kugel- oder Stechapfelform in einer NaCl- oder equilibrierten Salzlösung ist. In KSCN findet man aber die Kugelform (oder Stechapfelform). Dies gilt sowohl für Pferde- wie Menschen-R. In KJ (Versuche an Pferde-R.) herrscht die Stechapfelform vor (wenige plump bikonkave R.), in KNO_3 ist die Zahl der plump bikonkaven R. größer; in KBr die größte Anzahl der R. schön bikonkav $<$ KCl, nur wenige R. sternförmig $< K_2SO_4$, bikonkave oder glockenförmige R. Bezüglich der R.-Form wirken die Anionen deutlicherweise nach der Reihe SCN $>$ J $>$ NO_3 $>$ Br $>$ Cl $>$ SO_4.

Nicht nur eine Reibung (Glas +), sondern auch eine Aufladung des Glases von einem Elektrophor bewirkt die Veränderung der R. in NaCl, KCl oder Ringerlösung. Es ist also wirklich die Frage von einer Wirkung der elektrischen Ladung. Positive und negative Ladung haben aber dieselbe Wirkung. Es ist sicher nicht die Frage von einer direkten Aufladung der R. durch die Elektrizität des Glases. Wahrscheinlich handelt es sich um eine kolloidchemische Veränderung der R.-Oberfläche, die, wie soeben gezeigt, unter der Einwirkung gewisser Ionen direkt eintritt. Auch in der Ringerlösung findet man manchmal zahlreiche stechapfelförmige Pferde-R. auf ungeladenem Glase. Verminderung der R.-Konzentration scheint die Veränderung zu begünstigen. Interessant ist, daß eine Erhöhung der Ladung (sowohl + als −) des Glases (Ladung von einer Elektrizitätsmaschine) eine Tendenz zur Aggl. der gewaschenen Pferde-R. bewirken kann. Diese Aggl., die wohl ebenfalls als der Ausdruck einer kolloidchemischen Veränderung der R.-Oberfläche aufzufassen ist, tritt nicht in Na_2SO_4 oder K_2SO_4 (auch nicht in Oxalat, Tartrat, Citrat) ein. Man stelle diese Beobachtung mit unserer Schlußfolgerung (S. 14) zusammen, daß SO_4 die Oberfläche der R. verdichtet. KSCN scheint dagegen nicht gegen diese Aggl. zu schützen.

Die aggl. Wirkung der Schwermetallsalze, der $H^{\cdot}$, $Ba^{\cdot\cdot}$ usw. wäre gemäß der hier vertretenen Auffassung als die Folge einer Adsorption der positiven Ionen an die R.-Oberfläche aufzufassen. Rona und Michaelis (l. c. S. 13) geben folgende Reihe für die Adsorption der Kationen an:

$$K, Na, NH_4 < Ca, Mg < Zn < Cu < Al < H.$$

Bezüglich der Aggl. durch Schwermetalle habe ich die Reihe: Al, Cu $>$ Zn $>$ Cd beobachtet.

Zwischen den flockenden Kolloiden und den Salzen besteht eine Konkurrenz um die Oberfläche der R. Je mehr man den Salzgehalt senkt, desto stärker tritt die Kolloidwirkung hervor [I (1)].

Ich teile noch folgendes mit. In einer 0,4 proz. Gelatinelösung in 0,9% NaCl tritt nur eine spärliche Geldrollenbildung ein. Bei derselben

[1]) Diese Zeitschr. **108**, 52. 1920.

Gelatinekonzentration in 2 ccm NaCl + 3 ccm Mannit ist eine sehr schöne Geldrollenbildung eingetreten. In 1 ccm NaCl + 4 ccm Mannit mit 0,4% Gelatine ist die Geldrollenbildung sehr stark mit einer Tendenz zur Klumpenbildung überzugehen, die man bei starker Aggl. findet.

Erhöhung der Kolloidkonzentration (z. B. Gelatine) wirkt wie eine Senkung des Salzgehaltes. Es ist aus den angeführten Tatsachen wahrscheinlich, daß die Kolloide stärker als die Salze an der R.-Oberfläche adsorbiert werden und dabei die Salze von dieser verdrängen; eine Verminderung der Ladung und damit der Stabilität wird die Folge. Auf eine verminderte Ladung deuten die zahlreichen Kataphoreseversuche von Linzenmeier (l. c. oben S. 1). Ebenso unsere Ergebnisse über den Einfluß von Gelatine auf die Säureaggl.

Coulton[1]) findet, daß die negative Ladung, die von sensibilisierten R. getragen wird, kleiner ist als die der nichtsensibilisierten.

Bei der von uns vertretenen Auffassung braucht man nicht eine Entladung nur durch die Wirkung positiv geladener Kolloide anzunehmen (vgl. Linzenmeyer). Nach Fåhræus (Stability S. 148) hat z. B. Na-Caseinat eine stark beschleunigende Wirkung auf die S.G. der R.

Fåhræus[2]) hat nachgewiesen, daß die verschiedenen Eiweißfraktionen des Plasmas eine sehr verschiedene Wirkung auf die S.G. der R. ausüben: Fibrinogen > Globulin > Albumin.

Es scheint durch die Versuche und Überlegungen von Fåhræus wahrscheinlich, daß die Eiweißfraktionen als solche und nicht als Träger von „Agglutininen" wirken. Es besteht doch eine allzu auffallende Analogie zwischen der Wirkung der viscöseren Eiweißfraktionen des Plasmas und der von Kolloiden wie Gelatine, Na-Caseinat, Na-Nucleinsäure; von der letzteren habe ich wie Fåhræus eine stark flockende Wirkung beobachtet. Unerklärt bleibt immerhin noch die von Fåhræus untersuchte Stabilisierung in dem Gebiet der Körpertemperatur. — Es ist nicht ausgeschlossen, daß auch andere stark adsorbierbare Kolloide als die Eiweißstoffe eine Beschleunigung der S.G. bewirken. Bezüglich der Bedeutung des von Kürten[3]) untersuchten Cholesterins sei bemerkt, daß dieser Stoff in einer großen Zahl der pathologischen Zustände mit beschleunigter S.G., nicht vermehrt ist[4]).

Wenn unsere Auffassung über die Wirkungsweise der Kolloide richtig ist, soll eine stärkere Adsorbierbarkeit der stärker hydralisierten Eiweißstoffe vorliegen. Ich kann nur auf eine Angabe von J. Christiansen[5]) hinweisen, nach der das ionische (hydratisierte) Eiweiß eine verstärkte Adsorbierbarkeit an Filtrierpapier zeigt.

---

[1]) Journ. of gen. physiol. **3**. 309. 1921.

[2]) Hamburger Tagung d. Dtsch. physiol. Ges. 1920, Stability S. 114 u. f.

[3]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **185**, 248. 1920.

[4]) B. Majola, Fol. med. **6**. 1920. Zit. nach Ber. üb. d. ges. Physiol. **6**, 526. 1921.

[5]) Diese Zeitschr. **47**, 226. 1912.

Mehrere der unter I. genannten Versuche haben die Aufgabe gehabt, den Gedanken Fåhræus' von der Bedeutung der Hydratation der Eiweißstoffe für ihre Wirkung auf die S.G. zu prüfen. Man kann aber nie zwischen der Wirkung auf die Kolloide außerhalb der R. und der Wirkung auf die R. selbst sicher unterscheiden (vgl. V.). Bei Zusatz von kleinen Salzmengen [I (1)] zu einer Gelatine-Mannitlösung erhält man zwar die Reihe SCN > J > NO_3 > Br > Cl > SO_4, die mit der Einwirkung auf die Hydratation stimmt. Bei dem Vergleich zwischen Ca und Ba und K stimmt die S.G. nicht länger mit der Wirkung auf die Hydratation der Gelatinelösung. Wahrscheinlich hat man hier schon eine direkte Wirkung der entladenden zweiwertigen Kationen, die sich zur Wirkung der Gelatine addiert.

Zusatz von $CaCl_2$ und $BaCl_2$ zu dem Serum stabilisiert mehr als der Zusatz von NaCl oder KCl [I (17)]. Hier liegt wahrscheinlich vor allem eine Wirkung auf das Serum vor.

In ziemlich umfassenden Versuchsreihen habe ich die Wirkung von dem Zusatz kleiner Mengen Ziegenserum zu Pferdeserum auf die S.G. der R. des Pferdes geprüft.

3 ccm Pferdeserum + Ziegenserum + 2 ccm NaCl + 1,5 ccm R.

	0	0,01	0,025	0,05	0,1	0,15 ccm Ziegenserum
43′	50	62	61	78	98	90 ,

Die S.G. nimmt durch den Zusatz des Ziegenserums bedeutend zu. Steigert man den Gehalt an diesem noch mehr, nimmt die S.G. weiter zu.

	0	0,25	0,6	0,9 ccm Ziegenserum
32′	31	76	78	78

Ein ganz anderes Resultat erhält man bei Aufbewahrung der Mischungen in 36—37°, im folgenden Versuch während 19 St. Man findet nun eine ausgeprägt stabilisierende Wirkung des Zusatzes von Ziegenserum.

	K. 0°	K. 37°	0,3	0,6	0,9 ccm Ziegenserum
8 St.	> 110	21,5	11,5	10,5	5,5

Die S.G. wurde bei 18° beobachtet.

Auch wenn man kleine Mengen Ziegenblut dem Pferdeblut zusetzt, findet man nach der Wärmebehandlung eine stabilisierende Wirkung des abzentrifugierten Pferdeserums + Ziegenserum, wenn frische R. darin geschwemmt werden. Eine ganz ähnliche Wirkung wie das Ziegenserum hat der Zusatz von Diphtherietoxin.

Wir haben uns oben auf den Boden der elektrischen Theorie der Flockung der R. gestellt. Tatsächlich hat diese ja eine experimentelle Stütze in den Arbeiten von Höber[1]), Mangin und Henri[2]), Landsteiner[3]), Kozawa[4]), Fåhræus[5]), Linzenmeier[6]). Es liegt aber in der Kompliziert-

[1]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **101**, 627. 1904; vgl. Physik. Chemie d. Zelle usw. S. 600.

[2]) Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **56**, 866. 1904.

[3]) Diese Zeitschr. **50**, 176. 1913.

[4]) ib. **60**, 146. 1914.

[5]) ib. **98**, 355. 1918.

[6]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **181**, 169. 1920; **186**, 272. 1921.

heit der Erscheinung, daß mehrere Gesichtspunkte für das Problem in Betracht gezogen werden können. Die Ladung muß doch von außerordentlich wichtiger Bedeutung sein, da diese teils direkt, teils indirekt, durch Wirkung auf Oberflächenspannung und Bildung der Hydrathülle (vgl. Fåhræus, Stability S. 153), das Phänomen beeinflußt. Die Bedeutung der Hydrathülle ist von Herzfeld und Klinger[1]) und von Fåhræus betont worden. Der Beweis für die Existenz der Hydrathülle ist der Einfluß der R. auf die Viscosität des Blutes (Fåhræus, Stability S. 153). Es ist nun zuzugeben, daß die Hydrathülle auch durch andere Faktoren als die Ladung beeinflußt werden kann. Es ist z. B. denkbar, daß eine Änderung der chemischen Zusammensetzung der Oberfläche der R. einen Einfluß ausüben könnte.

Brinkman und v. Damm (l. c. oben S. 11) geben an, daß durch eine physiologisch equilibrierte Salzlösung ($NaCl$ 0,7, $NaHCO_3$ 0,18%, KCl 0,02%, $CaCl_2$ 6 aq. 0,02%) Lecithin aus den R. ausgewaschen wird. Die Versuchsergebnisse der Verfasser, wie sie vorgelegt sind, berechtigen aber zu dieser Schlußfolgerung nicht. Die von den Verfassern versprochenen quantitativen Ergebnisse müssen abgewartet werden. Ich bezweifle aber nicht, daß durch ein wiederholtes gründliches Auswaschen die R. allmählich verändert werden, wie aus den Ergebnissen Atkins[2]) zu schließen ist. Atkins hat eine Aggl. der gut gewaschenen R. verschiedener Tiere in 0,9% NaCl (1% Suspension 37°, 3 St.) beobachtet. An den R. des Pferdes habe ich diese Angaben nachgeprüft und bestätigt. Die R. sind in diesem Fall bikonkav oder glockenförmig. Es ist eine Veränderung der R. eingetreten, die wahrscheinlich ähnlicher Natur ist wie diejenige, die bei Aufbewahrung in Mannit eintritt (vgl. oben S. 8).

In einer Hinsicht haben die Kolloide eine, wie es scheint, ihnen eigene Wirkung. Nur bei der Gegenwart von Kolloiden, wie Plasma, Serum, Gelatine, tritt eine Geldrollenbildung ein. In einer kolloidfreien Lösung tritt die Flockung unter der Form von Klumpen auf. Dieser Unterschied kann ja nicht durch die Ladungshypothese erklärt werden.

Linzenmeier kommt in seiner letzten Abhandlung (l. c. oben S. 1) „zu einer anderen und zwar geringeren Bewertung der elektrischen Ladung der R. für ihr Sedimentierungsvermögen als früher". Aus seinen Versuchen geht wohl doch hervor, daß Gelatine die Ladung der R. herabsetzt. Albumin setzt zwar die Ladung der R. herab, aber wahrscheinlich in geringerem Grade als Gelatine (vergleichende Versuche über die Entladung durch $H^{\cdot}$ müssen hier gemacht werden. In Linzenmeiers Versuchen mit $La^{\cdot\cdot\cdot}$ kennt man bei Anwesenheit von Kolloiden nicht die Konzentration der freien $La^{\cdot\cdot\cdot}$). Am wichtigsten ist der Stärkeversuch Linzenmeiers (S. 284), worin höhere S.G. aber unveränderte Ladung festgestellt wird. Hier ist an eine Beeinflussung der Hydrathülle zu denken, vielleicht in dem Sinne, wie sich Fåhræus die Sache vorstellt (vgl. Stability S. 153).

---

[1]) Diese Zeitschr. **87**, 37. 1918.

[2]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap. **1**. 1909.

V. Über den Einfluß einiger Narkotica auf die Senkungsgeschwindigkeit der Blutkörper.

Durch die folgenden Tabellen erhält man einen Vergleich zwischen der Wirkung einiger verschiedener Alkohole.

(1) Methylalkohol. 3 ccm Serum + 2 ccm NaCl + 2 ccm R.

Zeit	K	0,05	0,1	0,4	0,7	1	1,3	1,6	1,9	2,2n
32′	34	42	32	21	10	8	5	5	2,2	2
1 St.	63	70	57	40,5	22	19	12,6	11	6,1	5,4

(2) Äthylalkohol. 3 ccm Serum + 2 ccm NaCl + 2 ccm R.

Zeit	K	0,033	0,05	0,1	0,4	0,7	1	1,3	1,6	2,2n
31′	30	25	23	21	6	4	2	1	0,8	0,3
1 St.	63	53,4	51,6	46,8	14,7	10,8	4,5	3,2	1,9	1

(3) Propylalkohol. 3 ccm Serum + 2 ccm NaCl + 2 ccm R.

Zeit	K	0,025	0,05	0,066	0,1	0,2	0,4	0,5	0,7	1	1,2n
20′	17	14	12	11	9,2	4	1,2	1,2	1,2	0	0
1 St. 50′	63	55	49,4	44	39	19	5,7	5,7	5,6	1,7	1,7

(4) Butylalkohol. 3 ccm Serum + 2 ccm NaCl + 2 ccm R.

Zeit	K	0,025	0,05	0,066	0,1	0,15	0,2	0,3	0,4n
1 St.	28	34	34,8	32	33	22,5	22,2	6	0
2 St. 41′	63	68	68	65	64	53	45,9	9	1,1

(5) Amylalkohol. 3 ccm Serum + 2 ccm NaCl + 2 ccm R.

Zeit	K	0,0125	0,025	0,05	0,075	0,1	0,125	0,15n
11′	29	37	28	35	25	14	0	0
19′	63	69	64	72	62	33	0	0

Die Versuche sind an verschiedenen Tagen und mit dem Blut von verschiedenen Pferden ausgeführt und zeigen zugleich, wie stark die S.G. der Pferde-R. variieren kann. Es kommt aber nicht auf die absoluten, sondern auf die relativen Werte an. Wenn man sich die Resultate graphisch darstellt, indem man die S.G. als Ordinate, die Normalität der Alkohole als Abscisse wählt und dabei die Versuche mit der Sed. der K. = 63 verwendet, findet man eine ganz ausgesprochene Gesetzmäßigkeit der Resultate. Je größer die Anzahl der Kohlenstoffatome des Alkohols, desto steiler ist der Anfangsteil der Kurve, d. h. desto früher tritt die Stabilisierung ein. Man findet an den Kurven einen Knick, rechts von diesem verläuft die Kurve der X-Achse fast parallel. Je höher der Alkohol, desto ausgeprägter der Knick. Die Normalität, bei der der Knick eintritt, wird bei steigender Kohlenstoffzahl immer niedriger. Nur der Butylalkohol scheint etwas aus der

Reihe zu fallen, wenn man die Konzentration unter 0,3 n berücksichtigt. Die Stabilisierung nimmt bis gegen die hämolytische Konzentration zu. In der Nähe von dieser tritt eine Quellung der Blutkörperchen ein, die unzweifelhaft die S.G. verzögert.

(6) Methylalkohol. 3 ccm Serum + 2 ccm NaCl + 2 ccm R.

Zeit	K	1	2	4	6 n
2 St. 45′	30	4,2	2	0,5	Hämolyse.

Gewisse Variationen sind zu verzeichnen. Oben ist die starke Stabilisierung in 0,1 n-Amylalkohol noch nicht eingetreten. In anderen Versuchen ist das der Fall gewesen. Isoamylalkohol verhält sich ungefähr wie der n-Amylalkohol.

(7) Isoamylalkohol. 3 ccm Serum + 2 ccm NaCl + 2 ccm R.

Zeit	K	0,0125	0,025	0,05	0,075	0,1	0,125	0,15 n
1 St. 28′	62	70	69	66	48	4,2	0,1	0,1

In dem Anfang meiner Studien habe ich die 0,1 n-Werte der verschiedenen Alkohole ermittelt. Das Resultat ist aus obigem vorauszusehen: Zunehmende Stabilisierung in der homologen Reihe, wobei der Butylalkohol herausfällt. Dasselbe ist bei dem Isopropyl- und dem Isobutylalkohol der Fall.

K.	Methyl-	Äthyl-	Propyl-	Isopropyl-	Butyl-	Isobutyl-	Amyl-	Isoamyl-
69	64	52	33	52	58	58	6	3,5

Wenn die R. statt wie in den vorangehenden Versuchen in 3 ccm Serum + 2 ccm NaCl in reines Serum geschwemmt werden, ändert sich das Bild der Versuche nicht. Die Alkohole hemmen auch die Sed. der R. des Pferdes in Ziegenserum, die sonst schneller als in Pferdeserum geht.

Von anderen Narkotica habe ich Äthylurethan und Aceton geprüft.

(8) Äthylurethan. 3 ccm Serum + 2 ccm NaCl + 1 ccm R.

Zeit	K	0,0125	0,025	0,05	0,075	0,1	0,2	0,4 n
2 St. 8′	63	62	58	46	34	25	18	16

(9) Aceton. 3 ccm Serum + 2 ccm NaCl + 1 ccm R.

Zeit	K	0,012	0,024	0,048	0,072	0,096	0,12	0,24	0,48 n
1 St. 18′	63	71	86	68	77	77	71	60	42

Zeit	K	0,72	0,96	1,2	1,44	1,68 n
1 St. 18′	63	14	2,3	0,2	0	0

In Aceton tritt bei den niedrigeren Konzentrationen eine Verstärkung der S.G. ein. Dasselbe findet man in den oben wiedergegebenen Versuchen mit Methyl-, Butyl-, Amyl- und Isoamylalkohol wieder. In einigen Ver-

suchen ist dasselbe bei Äthylalkohol und bei Äthylurethan beobachtet worden.

Auch in Gelatinelösungen findet eine stabilisierende Wirkung der Alkohole statt.

3 ccm 1 proz. Gelatinelösung in 0,9% NaCl + 2 ccm 0,9 proz. NaCl + Äthylalkohol + 1 ccm R.

(10)	K	0,35	0,7	1	1,25	2,45 n
27′	63	15,5	7	4	2	1

In Na-Nucleinsäure, die mir von Dr. E. Hammarsten gütigst zur Verfügung gestellt wurde, tritt, wie schon Fåhræus erwähnt, eine starke Flockung der R. ein. Der folgende Versuch zeigt die Wirkung von Äthylalkohol.

1,5 ccm Na-Nucleinsäure 1 proz. in 0,9% NaCl + 3,5 ccm 0,9 proz. NaCl + Äthylalkohol + 1 ccm R.

(11)	K	0,35	0,7	1,4	1,75	2,45 n
2 St. 30′	63	11,8	6	4,2	2	1,5

Wie schon aus Abt. I hervorgeht, spielen die Salze im Serum eine große Rolle für die S.G. der R. Die Salze üben auch einen ausgesprochenen Einfluß auf die Alkoholstabilisation der R. aus. Je geringer der Salzgehalt der Suspension der R., desto geringer die Stabilisation durch Alkohol. In dem folgenden Versuch wurde Serum (S) teils mit 0,9 proz. NaCl, teils mit 5,3 proz. Mannit (M) gemischt. Zu 5 ccm 1 ccm R.

(12)	K	0,35	0,7	1 n
3 S + 2 NaCl	63	22	10	5
2 S + 3 M	63	26	14	9
1 S + 4 M	63	58,3	42,9	57,2

In einem Versuch mit Na-Nucleinsäure wurde der Kolloidgehalt der Mischungen konstant gehalten. Der Elektrolytgehalt wurde hier durch 10,3 proz. Rohrzuckerlösung (Rz.) vermindert. 1 ccm R.

(13)	K	0,35	0,7	1,4	1,75	2,45 n
3 NaCl + 2 Rz.	62	20	12	13	19	31
2 „ + 3 „	61,5	31	27	27,5	73	75
0,5 „ + 4,5 „	68	70	64	66	80	94

Die Tabelle ist mit (11) direkt vergleichbar, wobei man die Werte für 5 ccm NaCl + 0 ccm Rohrzucker erhält. Schon in 3 ccm NaCl + 2 ccm Rohrzucker steigt die S. G. in den beiden höchsten Konzentrationen, ein Verhalten, das wiederholt gefunden wurde. In 5 ccm NaCl findet man dieses Verhalten nicht.

In reiner Rohrzuckerlösung (Mannitlösung) tritt, wie von Rohonyi (l. c. oben S. 12) und Radsma (l. c. oben S. 2) beobachtet, Aggl. leicht ein. Diese Aggl. wird nicht durch Alkohol verhindert und ebenso nicht die Aggl. durch Säurezusatz zu den Suspensionen der R. in Salzlösungen.

In Mannitlösung tritt sogar oft eine beschleunigte Aggl. der R. zufolge Alkoholzusatz ein. Dasselbe beobachtet man bei Schwemmung von 0,2 ccm R. in 1 ccm Serum + 4 ccm 10,3 proz. Rohrzucker oder 5,3 proz. Mannit. Bei den Äthylalkoholkonzentrationen 0,35, 0,7, 1, 1,4, 1,7 n ist eine stärkere Aggl. als in der K. eingetreten. Auch bei Versuchen mit der soeben erwähnten R.-Konzentration beobachtet man deutlich, daß bei Erhöhung des Serumgehaltes eine stabilisierende Wirkung der Alkohole eintritt.

Beiläufig erwähne ich hier eine Beobachtung über die Hämolyse durch Alkohol, die ich wiederholt gemacht habe. Eine Reihe von Mischungen isotonischer Mannit- und NaCl-Lösungen wurde hergestellt. Bei einer Konzentration von 1,62 n Propylalkohol ist nach 7′ vollständige Hämolyse in der reinen Salz- und nach 27′ in der reinen Mannitlösung eingetreten. Dann kommt die Reihe an die Mischung 4 ccm NaCl + 1 ccm Mannit und 3 ccm NaCl + 2 ccm Mannit (nach 35′ ungefähr 70%). Am meisten resistent gegen die Alkoholhämolyse sind die R. in den Mischungen 2 ccm NaCl + 3 ccm Mannit und 1 ccm NaCl + 4 ccm Mannit.

Die S.G. wurde auch in 0,9 proz. NaCl- und in Ringerlösung bei Zusatz verschiedener Alkohole untersucht. Wie bekannt, ist die Stabilität der R. des Pferdes in diesen Salzlösungen sehr groß. Die Ablesungen werden zweckmäßig erst nach 12—24 St. gemacht.

(14) Äthylalkoholversuch; 5 ccm Ringerlösung + 1 ccm R.

	K	0,09	0,175	0,35	0,7	1 n
21 St.	33,5	26	23,5	21	21	18

Zum Vergleich führen wir die entsprechenden Werte in 3 ccm Serum + 2 ccm Ringerlösung + 1 ccm R. desselben Aderlasses an.

(15)	25′	65	51	40	10,5	2,5	1,5

In Ringerlösung tritt keine Flockung der R. ein. Während im Serum die Sed. vor allem von der Größe der Flocken abhängt, wird in der Ringer- oder NaCl-Lösung die Größe der einzelnen R. eine Rolle spielen. Nach v. Knaffl-Lenz[1]) wissen wir, daß die R. in der Tat unter der Einwirkung der Narkotica eine Volumenverminderung erleiden. Wenn man aber auch mit der höchsten von v. Knaffl-Lenz beobachteten Volumenveränderung rechnet, findet man nach Stokes Formel, daß die Stabilisierung nicht durch die Volumenveränderung völlig erklärt werden kann. Ein anderer Faktor, der zu der Stabilisierung mit-

[1]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 171.

wirken könnte, ist die Formveränderung der R. unter dem Einfluß der Alkohole.

Die R. des Pferdes sind in der Ringerlösung im allgemeinen bikonkav (bei ungeladenem Objektträger beobachtet, vgl. Brinkman und v. Damm, l. c. S. 15; die R. des Pferdes nehmen aber viel eher die Stechapfelform als die R. des Menschen oder des Kaninchens an). Schon in der 0,09n-Äthylalkohollösung findet man aber, daß die R. ihren Durchmesser verkürzen, wobei die Oberfläche stachelig wird. In den Konzentrationen 0,7—1 n sind die R. aber vollkommen rund. Trotzdem ist die Stabilität hier am größten. Bei den bikonkaven R. ist das Verhältnis $\frac{\text{Oberfläche}}{\text{Volumen}}$ ungefähr 0,66, bei den runden sinkt es auf 0,49.

Die Stabilisierung der R. in Serum oder Serum + NaCl oder Ringerlösung bei Alkoholzusatz hängt von einer verminderten Flockung der R. ab. Bei steigender Alkoholkonzentration nimmt die Geldrollenbildung ab und gleichzeitig fangen die R. an, sternförmig zu werden. In 0,175n-Äthylalkohol sind die Geldrollen noch zahlreich, obgleich deutlich kürzer, als in der K. Die freien R. haben oft Sternform. In 0,35n sind die Geldrollen sehr spärlich. Sternförmige R. bilden aber kleine mehr unregelmäßige Flocken. In 0,7n findet man noch solche Flocken, aber spärlicher. Von 1:n an hört praktisch jegliche Flockung auf.

Wenn man das Serum mit z. B. 0,9proz. NaCl verdünnt, erhält man bekanntlich eine ähnliche Abnahme der Geldrollenbildung, wobei gleichzeitig die S.G. abnimmt. Man hat den Eindruck, daß die Narkotica die Wirkung der Kolloide ausschalten.

VI. Besprechung der Ergebnisse über die Einwirkung der Narkotica.

Trotz der auffallenden Wirkung der Narkotica ist es doch schwer, eine einfache Erklärung ihrer Wirkung zu geben.

Nach Höber[1]) und Linzenmeyer[2]) verdrängen die Narkotica die „agglutinierenden Körper" (L., S. 182) aus der Oberfläche der R. Diese Erklärung ist ja sehr wahrscheinlich und naheliegend. Eigentümlich ist aber dabei folgendes. Pferdeserum ist ein sehr guter Schutzkolloid für Kaolin. Zusatz von Alkohol verstärkt diese Wirkung. Bei einer Verdrängung würde die schützende Wirkung geschwächt werden.

Wahrscheinlich spielen noch andere Momente als eine Verdrängung ein.

---

[1]) Hamburger Tagung d. Dtsch. physiol. Ges. 1920.

[2]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **181**, 169. 1920.

Simon[1]) hat gezeigt, daß Zusatz von Alkohol die Hitzekoagulationstemperatur des Serums erniedrigt, was wohl als Ausdruck einer dehydrierenden Wirkung der Alkohole aufzufassen ist. Ich habe in mehreren Fällen die Hitzekoagulationsgeschwindigkeit des Serums nach Alkoholzusatz bestimmt; eine unverkennbare Korrelation mit der S.G. der R. ist dabei beobachtet worden. Je größer die Geschwindigkeit der Koagulation, desto stabiler die R. in derselben Mischung. Angesichts dieser Tatsachen muß man mit einer Zustandsänderung der Kolloide als einem Faktor bei der Stabilisierung durch Alkohole rechnen. Wie oben schon genannt, setzt Fåhræus (Stability S. 153) die Wirkung der Kolloide mit ihrer Hydratation in Verbindung. Durch die Alkohole wird wahrscheinlich eine Dehydratation bewirkt.

Die oben dargelegte Tatsache, daß die stabilisierende Wirkung der Alkohole bei Verminderung des Salzgehaltes der Mischungen abnimmt, deutet auch daran, daß es sich um Wirkungen auf den Zustand der Kolloide handelt. Man wird an die Einwirkung der Salze auf die Fällbarkeit des Säurealbumins durch Alkohol erinnert [Schorr[2])], wobei ich den großen Unterschied der beiden Fälle natürlich nicht übersehe.

Die Ergebnisse v. Knaffls (l. c. oben S. 22) zeigen, daß die Narkotica eine dehydrierende Wirkung auf die R.-Kolloide ausüben. Nach Beobachtungen über die R.-Form scheint es mir wahrscheinlich, daß die dehydrierende Wirkung bei Senkung des Salzgehaltes erst bei höherer Alkoholkonzentration eintritt. Wie oben genannt, tritt die Stechapfelform in Ringerlösung (oder 0,9 proz. NaCl) schon in der Äthylalkoholkonzentration 0,09 n ein. In einer Mischung 4,5 ccm Rohrzuckerlösung + 0,5 ccm 0,9 proz. NaCl treten zackige Formen erst bei 0,525 n Äthylalkohol auf. Bei den niederen Konzentrationen glockenförmige R.

Es ist möglich, daß auch die Veränderung der Oberfläche der R. einen Einfluß auf deren Stabilität ausüben kann. Wir haben ja oben einen auffallenden Parallelismus zwischen Stabilität und Resistenz gegen Hypotonie gefunden (III). Diese Übereinstimmung kehrt hier zurück. Die stabilisierenden Alkoholkonzentrationen üben, wie schon aus den Versuchen von Arrhenius und Bubanovic[3]) zu entnehmen ist, eine erhöhende Wirkung auf die Resistenz der R. gegen Hypotonie aus.

Aus V (1), (2), (3), (4), (5) kann man die Konzentration der Alkohole herauslesen, die gleiche Sed. geben. Man wird z. B. finden, daß die folgenden molaren Konzentrationen die Sed. 30 mm bei einer Sed. der K. von 63 mm geben: Methyl- 0,58, Äthyl- 0,25, Propyl- 0,15, Butyl- 0,24, Amylalkohol 0,11. Wenn man die Konzentrationen als Ordinaten absetzt, erhält man eine abfallende Kurve, wo doch der Wert für Butylalkohol herausfällt. Wählt man dagegen die Sed. 5,4 mm bei einer Sed. der K. von 63 mm, erhält man folgende Werte der Konzentrationen: Methyl- 2,2, Äthyl- 0,957, Propyl- 0,396, Butyl- 0,24 und Amylalkohol 0,11 n.

[1]) Arch. di fisiol. **5**. 1908.

[2]) Diese Zeitschr. **37**, 424. 1911.

[3]) Meddel. K. Vetensk. Akad. Nobelinst. **2**. 1913.

Die Kurve ist hier steiler als in dem oben herausgelesenen Fall. Man wird finden, daß die Werte sehr genau denjenigen proportional sind, die nach Fühner und Neubauer[1]) eben Hämolyse hervorrufen. Wenn man sich die Verhältnisse durch Kurven veranschaulicht, wird man finden, daß diese sehr nahe parallel verlaufen. Dasselbe gilt, wenn man mit den Konzentrationen der verschiedenen Alkohole vergleicht, die nach Warburg[2]) die Oxydation in den Erythrocyten der Gans hemmen, die nach Warburg und Wiesel[3]) fast vollständige Gärungshemmung der Acetondauerhefe bewirken. Eine ähnliche Kurve bilden auch die Werte der Konzentrationen, die nach Meyerhof[4]) 30% Hemmung der Rohrzuckerinversion durch Invertase bei 29° bewirken. Spiro[5]) hat die fällende Wirkung der Alkohole auf Eiereiweiß untersucht. Die Fällungskonzentrationen in Mol ausgedrückt, bilden eine sehr ähnliche Kurve wie in den oben angeführten Fällen (Methyl- 6,2, Äthyl- 3,8, Propyl- 2,1, Butyl 0,7, Amylalkohol 0,43. Ebenso besteht Parallelismus mit den von Overton ermittelten narkotischen Konzentrationen für Kaulquappen[6]). Warburg und Wiesel heben die fällende Wirkung der Narkotica hervor. Bei ihren Versuchen liegt sicher keine „lipoidlösende" Wirkung vor. Bei den obengenannten Versuchen Meyerhofs über die Wirkung der Narkotica auf die Invertase geben die Werte der prozentischen Hemmung Kurven, die an Adsorptionskurven erinnern. Sie werden mit der Zunahme der Kohlenstoffatome immer steiler. Wenn wir unsere Resultate statt in Millimeter Sed. als prozentische Hemmung derselben ausdrücken wollen, erhalten wir Kurven, die ganz außerordentlich an die Kurven Meyerhofs erinnern. Sie haben dieselbe Ähnlichkeit mit Adsorptionskurven und verändern auf dieselbe Weise ihre Form mit steigender Kohlenstoffanzahl. Es handelt sich in unseren Versuchen um eine Bindung teils an die Serumkolloide (bzw. Gelatine usw.), teils an die R.

Zusammenfassung einiger Ergebnisse.

Die S.G. der R. wird in verschiedenen Salzen und bei verschiedenen Konzentrationen derselben untersucht. Die Reihenfolge der Ionen wird u. a. von der Konzentration bestimmt. Zusatz von HCl kann die Reihenfolge der Anionen verändern.

Bei Erhöhung der Konzentration des Suspensionsmittels der R. an Alkalisalzen steigt die zur Aggl. der R. notwendigen [H˙].

---

[1]) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **56**. 1907; zit. nach Höber, Physikalische Chemie der Zelle usw. 4. Aufl., S. 408. 1914.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **70**. 1911.

[3]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **144**. 1912.

[4]) ib. **157**. 1914.

[5]) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **4**. 1903.

[6]) Zit. nach Höber, Physikalische Chemie der Zelle usw. 4. Aufl., S. 459. 1914.

Eine ähnliche Gesetzmäßigkeit findet man bei Aggl. durch Schwermetallsalze.

Es besteht eine unverkennbare Beziehung zwischen Resistenz der R. gegen starke Hypotonie (Δ der Lösungen = 0,28) und der S.G. Je stabiler die R., desto größer ihre Resistenz.

Es hat sich als wahrscheinlich herausgestellt, daß die Wirkung der Ionen als Folge von einer Adsorption derselben an die R.-Oberfläche aufzufassen ist. Die Wirkung der Kolloide (Serum, Gelatine usw.) wird als eine „Konkurrenz" derselben mit den Elektrolyten um die Oberfläche der R. aufgefaßt. Bei Senkung der Konzentration von Alkalisalzen in der Suspensionsflüssigkeit der R. wird die flockende Wirkung der Kolloide verstärkt.

Bei der Wirkung der Narkotica auf die S.G. besteht dasselbe Verhältnis zwischen der Wirkung der Glieder homologer Reihen wie früher bei verschiedenen Vorgängen (Narkose, Atmungshemmung usw.) beobachtet.

Die stabilisierende Wirkung der Alkohole nimmt bei Senkung der Konzentration von Alkalisalzen in der Suspensionsflüssigkeit ab. Bei sehr geringer Elektrolytenkonzentration können die Alkohole sogar die Flockung beschleunigen.

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

XLVII. Mitteilung.

Von

Leon Asher.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Bern.)

Die Beziehungen zwischen Thymus, Milz und Knochenmark.

Von

Gengo Matsuno (Nagoya, Japan).

(Eingegangen am 21. Juni 1921.)

Mit 13 Abbildungen im Text.

Die Thymus wird herkömmlich zu dem System des lymphatischen Apparates gerechnet und in dieser Bezeichnung liegt auch eine funktionelle Deutung, denn man meint, daß die Thymus in Beziehung zur Entstehung der lymphatischen Elemente des Körpers steht. Mehr auf dem Gebiete der Pathologie als auf demjenigen der Physiologie sind die Stützen für diese Auffassung einer funktionellen Bedeutung der Thymus erwachsen. Die funktionelle Stellung der Thymus im Organismus ist trotz bemerkenswerter und aufklärender Arbeiten der letzten Jahre durchaus nicht eindeutig festgelegt. Es liegt wahrscheinlich in den Tatsachen begründet, daß diese eindeutige Festlegung nicht stattfinden kann, weil die Thymusdrüse keine einheitliche Funktion besitzt. Gerade die Arbeiten aus dem Berner Physiologischen Institut, denen sich die meinige anschließt, haben hierauf hingewiesen. Sowohl H. Müller wie auch del Campo zeigten, daß die Thymusdrüse in Beziehung zur Muskeltätigkeit stehen kann, indem sie nachwiesen, daß Injektion von Thymusextrakten die Muskelermüdung verzögerte. Während diese neuen Tatsachen völlig außerhalb des Rahmens der herkömmlichen Betrachtungs-

weise der Thymusfunktion liegen, schließt sich die bemerkenswerte von Ruchti gefundene Tatsache, daß Fehlen der Thymusdrüse die Ausfallserscheinungen der Schilddrüse ganz wesentlich steigert, der Fragestellung an, die namentlich in der Pathologie vielfach diskutiert worden ist. Auch die hieran anschließende Arbeit von Nyffenegger brachte neue Tatsachen in dieser Richtung zutage.

Im Anschluß an diese Arbeit schien es geraten, die Beziehung zwischen Thymus und Knochenmark einer erneuten Untersuchung zu unterziehen. Da durch die bekannten Arbeiten von Bache, Klose und Matti sehr auffallende Beziehungen zwischen Thymus und Knochengewebe aufgedeckt worden waren, mußte auch daran gedacht werden, daß das Knochenmark auch in Beziehung zur Thymus gesetzt sei. Beziehungen zwischen Knochenmark und Drüsen mit innerer Sekretion sind schon früher im Berner Physiologischen Institut untersucht worden. Am umfassendsten von Marcel Dubois (diese Zeitschr. 31, 141. 1917). Dubois untersuchte das Zusammenwirken von Milz, Schilddrüse und Knochenmark. Er bediente sich als Prüfungsmittel für die Leistungsfähigkeit des Knochenmarks der Untersuchung des sog. relativen weißen Blutbildes, daneben auch der Hämoglobinbestimmung. Seine Ergebnisse führten ihn zu der Auffassung, daß in bezug auf das Knochenmark ein Antagonismus zwischen Milz und Schilddrüse bestände. Es liegt in der Natur der angewandten Methode, daß die erhaltenen Ergebnisse nicht jenen Grad von Eindeutigkeit besitzen können, welcher anderen Methoden zukommt. Hier muß die Variierung der Gesichtspunkte dazu verhelfen, die Möglichkeit des Einblickes zu vertiefen. Aus diesem Grunde folgte ich gern der Aufforderung von Prof. Asher, die Beziehung zwischen Thymus und Knochenmark mit Hilfe von Blutuntersuchungen experimentell zu erforschen. Das wichtigste Verfahren war von vornherein gegeben. Die Untersuchung des relativen weißen Blutbildes sowie des Hämoglobingehaltes vor und nach der Thymusexstirpation. Nun liegen schon viele Erfahrungen vor, welche lehren, daß die bloße Entfernung eines Organs vom Charakter der Thymus an und für sich keine weitergehenden Aufschlüsse zu erteilen vermag. Es gehört dazu noch, daß man neue experimentelle Bedingungen schafft, welche nicht leicht erkennbare, aber tatsächlich vorhandene Ausfallssymptome

aufzudecken vermögen. Hierzu empfahlen sich 2 Eingriffe, die schon in den Arbeiten von Sollberger (Asher und Sollberger, diese Zeitschr. 55, 13) sowie von Dubois angewandt wurden, nämlich der Blutentzug und experimentelle Anämie durch ein chemisches Gift herbeigeführt, z. B. Cyanwasserstoff. Sowohl der Blutentzug wie auch der Sauerstoffmangel wirkten als ein Reiz auf das Knochenmark. Wenn wir demnach diese beiden Eingriffe vor und nach der Thymusexstirpation anwenden, prüfen wir gewissermaßen die Reaktionsfähigkeit des Knochenmarks auf einen dosierbaren Reiz in 2 verschiedenen Zuständen. Ich habe auch einige Untersuchungen an Tieren ausgeführt, denen nicht nur die Thymus, sondern auch die Milz exstirpiert worden war.

Für meine Experimente wählte ich das Kaninchen. Es wurden möglichst gleichalte und gleichgroße Tiere gewählt und diese unter den gleichen Bedingungen gehalten. Eine besondere Diät brauchte nicht beobachtet zu werden.

Da bekannt ist, daß sich das weiße Blutbild nach der Nahrungsaufnahme ändert, erfolgte die Blutentnahme möglichst zu gleichen Zeiten, um derartige Fehler auszuschließen. Zu jedem neuen Eingriff wurden frische Tiere benutzt.

Zur Hämoglobinbestimmung diente das Hämometer nach Sahli, zur Zählung von Erythro- und Leukocyten der Thomasche Apparat. Als Verdünnungsmittel diente Hayernsche Lösung für die roten und eine Lösung von Essigsäure und Gentianaviolett für die weißen Blutkörperchen.

Das histologische Blutbild wurde an Ausstrichpräparaten auf Objektträgern untersucht. Ein Blutstropfen kam auf das gut gereinigte Glas und wurde mit dem Rande eines Deckgläschens möglichst gleichmäßig verstrichen. Ich wählte, um die Resultate sicherer zu gestalten, verschiedene Färbungsmethoden, so nach Ehrlich (Triacid), nach Germer-May, nach May-Grünwald und nach Romanowsky-Giemsa. Es wurde Doppelfärbung benutzt. Letztere bewährte sich mit der Zeit besonders, und die Erfahrung lehrte, daß sie sich in folgender Modifikation für das Kaninchen eignete: Die lufttrockenen Präparate wurden während 3 Minuten in Methylalkohol fixiert. Im Verhältnis von einem Tropfen Farbe zu 1 ccm dest. Wasser wurde die Farblösung jedesmal frisch bereitet. Die fixierten und getrockneten Präparate kamen während 20—25 Minuten mit der Farbe in Berührung, nachher wurden sie in Brunnenwasser kurz abgespült, dann getrocknet und vermittels eines Immersionssystems untersucht.

Zählung der Leukocyten: Die Zählung erfolgte jedesmal so lange, bis mindestens 800—1000 Leukocyten differenziert waren. Diese Zahl erwies sich als genügend, um sichere Resultate im relativen Blutbilde zu erhalten, was sich gelegentlich durch größere Zählung bestätigte.

Das Blut entnahm ich den Ohrvenen, nachdem ich vorher das Ohr sorgfältig mit Alkohol und Äther gereinigt hatte. Die Öffnung der Venen

erfolgte durch schräges Einstechen mit einer sterilen Stecknadel, dann wurde das hervorquellende Blut ohne Druck aufgefangen. Mit dieser einfachen Methode ließen sich bessere Resultate erzielen als mit den üblichen Schneppern. Die Gefäßverletzung konnte so auf ein Minimum beschränkt bleiben, die kleine Wunde schloß sich jeweilen sehr rasch und spurlos. Das war für fortgesetzte Untersuchungen sehr wünschenswert im Interesse einer möglichst geringen Trübung des Blutbildes.

Vor allem galt es, an den Tieren Voruntersuchungen anzustellen, um von den physiologischen Schwankungen Kenntnis zu nehmen und um vor allem das weiße Blutbild des Kaninchens, das ich in keiner Literaturangabe fand, festzuhalten. Während der ganzen Dauer der Versuche wurden selbstverständlich Kontrolltiere unter den gleichen Bedingungen beobachtet.

Die Operationen.

Für die Untersuchungen wurden mehrere Tiere operiert, um möglichst sichere Resultate zu erhalten. Eine halbe Stunde vor der Operation bekamen die Kaninchen 2% Morphium muriat. subcutan injiziert.

Selbstverständlich erfolgte die Operation unter streng aseptischen Kautelen, wobei auch die Desinfektion des Kaninchenfelles in gehöriger Weise erfolgte, galt es doch, auch die geringste Infektion auszuschließen.

Die Blutentnahme.

Haare abrasiert; starke Hautdesinfektion; mit Jodtinktur gepinselt, an der Mittellinie: Längsschnitt von 15 cm, auf der rechten Seite den Muskel mit einer Pinzette weggenommen, dann kann man die rechte Carotis sehen. Oberer Teil der Carotis abgebunden; mit geknickter Kanüle Blutentzug von 30–40 g.

Die Splenektomie.

Kurzer Schnitt in der Linea alba vom Processus xiphoideus sterni an nach abwärts. Eröffnung des Peritoneums. Eingehen auf die Milz an der großen Kurvatur des Magens vorbei. Sorgfältiges Fassen der Milzgefäße mit Arterienklemmen. Unterbindungen. Exstirpation des Organs. Reposition der prolabierten Eingeweide. Schließen der Bauchdecken durch Knopfnähte. Blutverlust fast Null.

Die Thymusektomie.

Durch einen 3 cm langen von Mitte Hals bis Manubrium sterni reichenden Schnitt durch Hautfascie und Muskulatur wird die Trachea freigelegt. Mittels stumpfen Hakens wird das Brustbein in die Höhe gehoben und die neutrale Halsmuskulatur leicht seitwärts gezogen. Ventral der Gabelung derVena cava cranii ist der vordere Zipfel der Thymus als gräuliches, fettähnliches Gewebe sichtbar, umgeben von einer dünnen Bindegewebskapsel. In dieser Gegend weist die Drüse ziemlich schwer lösbare Verbindungen mit den Gefäßen auf. Die Kapsel wird sorgfältig angeschnitten, die Thymus mit breiten Pinzetten gefaßt und durch leichten Zug entwickelt. Zur voll-

ständigen Exstirpation erfordert das äußerst leicht zerreißbare Organ neben großer Vorsicht, fast im Widerspruch zur Größe der Drüse stehend, breite Pinzetten. Die beiden Lappen lösen sich im allgemeinen sehr leicht. Eine allfällige venöse Blutung ist durch Aufdrücken eines Tupfers sofort stillbar, hat übrigens bei aseptischem Vorgehen nichts zu bedeuten.

An den Folgen der verschiedenen Operationen sind von 10 Tieren die 4 erstoperierten eingegangen. Todesursache war einmal beiderseitiger Pneumothorax, einmal beiderseitige Pneumonie, wahrscheinlich infolge Pleuraverletzung, noch 2 mal eitrige Pleuritis infolge Wundvereiterung.

Im übrigen heilten alle Wunden per primam ab: Später ausgeführte Sektionen bewiesen die sowohl vollständige Entfernung der Thymus als auch der Milz. Verdächtige Gewebspartien, im besonderen größere Fettpartien wurden jeweilen mikroskopisch untersucht. Von Krause wird das Gewicht der Thymus beim Kaninchen mit 1,1 g angegeben. Klose und Vogt haben nach eigenen Bestimmungen bei Tieren im Alter bis zu 7 Wochen ein durchschnittliches Thymusgewicht von 2,6 g festgestellt. Nach Sönderlund und Backmann beträgt das Thymusgewicht von 4—6 Wochen alten Kaninchen 1,07 g und steigt auf maximal 2,49 g bei 4 Monate alten Kaninchen. Die von mir operierten Tiere standen in einem mittleren Alter von 15 Wochen und wogen 1500—2000 g, im Mittel 1780 g. Das Gewicht der exstirpierten Drüsen schwankte von 1,50—2,95 g.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen habe ich in den nachfolgenden Protokollen und in Kurven niedergelegt. Ich will in großen Zügen die Tatsachen, die ich gefunden habe, beschreiben.

Die Exstirpation der Thymusdrüse führt zu Änderungen im Blutbild, welche ziemlich ausgesprochen sind, wenngleich individuell der Betrag derselben schwankend sein kann. Ich finde zunächst, daß kurze Zeit nach der Exstirpation eine kleine Verminderung der Hämoglobinmenge eintritt, die sich aber bald wieder ausgleicht. Etwas ausgesprochener sind die Veränderungen im weißen Blutbild. Die Zahl der Lymphocyten steigt, während die Zahl der Leukocyten sinkt. Sehr viel ausgesprochener sind die Ergebnisse bei Anwendung der beiden Reizmittel des Knochenmarks, dem Blutentzug und der Injektion einer kleinen Menge von Cyanwasserstoff. Was das normale Tier anbetrifft, so sind meine Befunde die gleichen wie diejenigen früherer Autoren. Die Hämoglobinmenge sinkt sofort nach dem Eingriff und kehrt allmählich zur Norm zurück. Sehr deutlich sind die Erscheinungen hinsichtlich des relativen weißen Blutbildes. Sofort nach dem Blutentzug kommt es zu einem tiefen Sturz der Lymphocyten und einer noch starken Steigerung der Leukocytenzahl. Genau

die gleichen Erscheinungen sieht man nach Injektion von Cyanwasserstoff. Ganz anders gestaltet sich das Verhalten nach Entfernung der Thymusdrüse. Der Blutentzug hat sowohl eine ganz geringfügige Verminderung der Hämoglobinmenge, ein kaum merkliches Steigen der Leukocytenzahl und nur eine sehr geringfügige Veränderung in der Menge der Lymphocyten zur Folge. Genau das gleiche gilt für die Wirkungen des Cyans.

Was nun die Entfernung der Milz bei Tieren anbetrifft, denen vorher die Thymusdrüse entfernt worden war, so hat dieser Eingriff kaum irgendwelche bemerkenswerten Folgen. Namentlich tritt nicht die Erscheinung ein, die Dubois bei der bloßen Entfernung der Milz beschrieben hat, eine Abnahme der Lymphocytenzahl und eine Zunahme der Leukocyten; höchstens letzteres kann angedeutet sein. Die Reaktion auf Blutentzug und auf Cyanwasserstoff wird durch die nachfolgende Exstirpation der Milz nicht beeinflußt. Man muß daraus schließen, daß im Symptomenbild das Fehlen der Thymusdrüse überwiegt. Ich glaube nicht fehlzugehen, wenn ich die von mir gefundenen Tatsachen als einen Ausdruck des Einflusses der Thymusdrüse auf das Knochenmark ansehe. Fehlen der Thymusdrüse mindert die Reaktionsfähigkeit des Knochenmarks. Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß bei Vorhandensein der Thymusdrüse diese einen fördernden Einfluß auf das Knochenmark ausübt. Welches auch der Einfluß der Milz sei — daß ein solcher vorhanden ist, wurde durch die Arbeiten von Sollberger und Dubois bewiesen —, die Thymus, solange sie in funktionsfähigem Zustande sich befindet, übt einen größeren Einfluß aus.

Der wesentlichste Inhalt der vorstehenden Arbeit ist der nachfolgende:

Um die Beziehung zwischen Thymus und Knochenmark zu prüfen, wurde Hämoglobingehalt und relatives weißes Blutbild vor und nach Exstirpation der Thymus untersucht, wobei hauptsächlich die Reaktion auf Blutentzug und auch durch Cyanwasserstoff herbeigeführter Sauerstoffmangel als Prüfungsmittel benutzt wurde. Die Untersuchung ergab, daß die Thymusdrüse einen fördernden Einfluß auf das Knochenmark ausübt, der wegfällt, wenn die Thymusdrüse fehlt.

Die Entfernung der Milz vermag an dem Symptomenbild des Thymusausfalles nichts Wesentliches zu ändern.

Zum Schlusse sei mir gestattet, meinem verehrten Chef, Herrn Prof. Leon Asher für seine Anregung und Leitung und Herrn Prof. K. Sugi für seine liebenswürdige Unterstützung bei dieser Arbeit meinen herzlichen Dank auszusprechen.

Tabelle I.

Kontrolltier.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Leukocyten
16. X. 20	76	4 600 000	9 900
18. X. „	78	4 859 000	9 600
21. X. „	76	4 578 000	8 700
26. X. „	78	4 298 000	9 200
27. X. 20 Blutentzug (ca. 35 g). Körpergewicht 2100 g.			
28. X. 20	64	2 580 000	12 000
30. X. „	68	3 780 000	10 200
1. XI. „	69	3 960 000	9 000
5. XI. „	72	4 680 000	8 800
8. XI. „	74	4 855 000,0	9 200,0

Kontrolltier.

Datum	Lymphoc.	Neutr.	Eosino.	Basophil.	Überg.	Monoc.	Myelo.
16. X. 20	53,3	34,0	0,75	3,75	4,0	2,5	—
18. X. „	55,75	34,75	0,5	2,25	3,5	3,75	—
21. X. „	58,0	30,0	0,5	2,7	3,7	3,5	—
26. X. „	53,5	38,5	0,5	1,75	3,25	2,75	—
27. X. 20 Blutentzug (ca. 35 g). Körpergewicht 2100 g.							
28. X. 20	40,0	52,75	1,0	1,0	1,0	3,0	1,25
29. X. „	43,0	47,50	1,75	1,5	2,5	2,50	1,25
30. X. „	44,075	45,45	1,5	2,0	3,75	2,0	1,0
1. XI. „	56,5	37,25	1,0	0	3,0	1,0	0,5
3. XI. „	51,5	40,5	1,25	3	2,25	1,5	—
5. XI. „	57,5	35,0	1,5	2,0	1,0	3,0	—

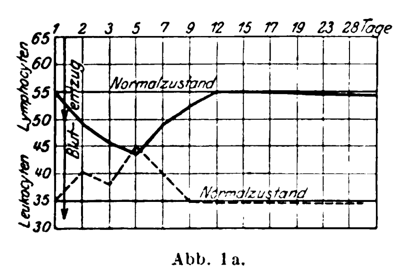


Abb. 1a.

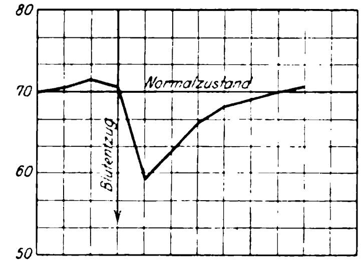


Abb. 1b.

Tabelle II. Kontrolltier.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Weiße Blutkörp.
18. X. 20	72	4 225 000	8 600,0
19. X. „	76	5 700 000	7 800,0
20. X. „	72	4 370 000,0	8 000,0
21. X. „	73	4 495 000,0	7 700,0
25. X. „	77	5 051 000	8 700
27. X. „	74	4 953 000	9 200,0
28. X. „	75	4 894 000	9 700
1. XI. 20 Blutentzug (aus rechter Carotis). Körpergewicht 2020 g.			
2. XI. 20	65	3 200 000	12 000
3. XI. „	69	3 750 000	13 000
4. XI. „	69	3 950 000	9 200
5. XI. „	72	4 045 000	8 700
8. XI. „	74	4 630 000	9 200
9. XI. „	73	4 730 000	8 600

Kontrolltier.

Datum	Lymphoc.	Neutr.	Eosino.	Basophil.	Überg.	Monoc.	Myelo.
18. X. 20	63,25	28,5	1,0	2,0	2,75	2,5	—
19. X. „	57,25	34,0	0,75	2,75	3,0	2,25	—
20. X. „	67,75	24,5	0,5	2,0	2,5	2,5	0,25
21. X. „	56,0	32,0	0,75	3,0	5,25	3,0	—
25. X. „	56,75	34,25	1,0	1,75	2,75	3,0	—
27. X. „	58,75	34,25	0,5	1,75	2,75	2,0	—
28. X. „	55,5	37,0	0,5	1,0	4,0	2,0	—
1. XI. 20 Blutentzug (aus rechter Carotis). Körpergewicht 2020 g.							
2. XI. 20	39,75	51,0	1,0	2,0	3,5	2,0	0,75
3. XI. „	42,0	52,5	0,5	0,5	2,0	2,0	0,5
4. XI. „	42,25	49,0	0,25	1,25	4,0	2,5	0,75
5. XI. „	58,5	32,5	0,75	2,25	3,5	2,0	0,5
8. XI. „	58,5	33,25	1,25	2,75	3,25	1,0	—
9. XI. „	58,75	32,75	1,0	1,75	3,25	2,5	—

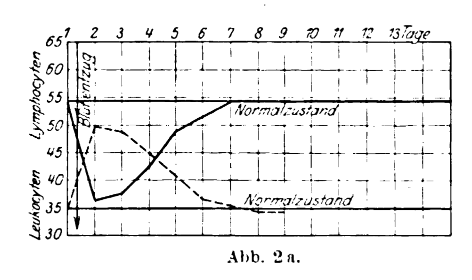


Abb. 2 a.

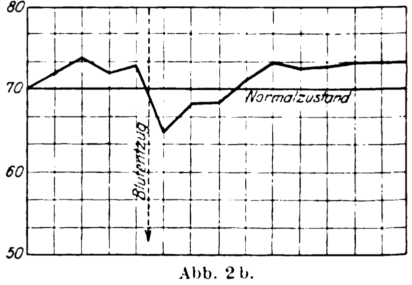


Abb. 2 b.

Tabelle III.

Kaninchen grau.

Körpergewicht 2100 g. Normale Tiere.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Weiße Blutkörp.
17. IV. 21	70	4 140 000	10 200
18. IV. „	70	4 120 000	9 000
21. IV. „	73	4 225 000	9 500
22. IV. „	73	4 725 000	8 600
23. IV. „	71	4 560 000	8 400

23. IV. 21 Entfernung von Thymus.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Weiße Blutkörp.
28. IV. 21	70	4 560 000	8 700
29. IV. „	74	4 675 000	8 100
30. IV. „	73	4 825 000	9 700
2. V. „	72	4 606 000	10 100
4. V. „	70	4 030 000	9 000
5. V. „	73	4 630 000	8 700
7. V. „	73	4 725 000	9 100
11. V. „	72	4 525 000	9 200
15. V. „	73	4 825 000	9 800
18. V. „	72	4 435 000	10 100
20. V. „	73	4 830 000	9 010
23. V. „	74	5 130 000	8 600

Körpergewicht 2100 g. Normale Tiere.

Datum	Lymphoc.	Neutr.	Eosino.	Basophil.	Überg.	Monoc.
17. IV. 21	60,25	34,0	0,75	1,5	1,5	2,0
18. IV. „	58,0	33,0	0,75	2,75	3,0	2,5
21. IV. „	59,0	36,25	0,25	1,0	2,5	1,0
22. IV. „	60,75	32,25	0,5	3,0	2,25	1,25
23. IV. „	55,25	36,75	0,25	2,5	2,5	2,75

23. IV. 21 Entfernung von Thymus.

Datum	Lymphoc.	Neutr.	Eosino.	Basophil.	Überg.	Monoc.
28. IV. 21	54,75	39,0	0,5	1,5	2,75	1,5
29. IV. „	59,5	31,0	0,75	3,25	2,0	3,5
30. IV. „	61,0	32,25	1,0	1,0	2,25	1,75
2. V. „	63,0	31,0	0,75	1,25	2,0	2,0
4. V. „	62,0	32,0	0,25	1,75	2,25	2,0
5. V. „	63,0	30,25	1,0	2,0	2,75	1,0
7. V. „	64,25	30,75	6,5	1,25	1,0	1,25
11. V. „	60,0	32,25	0,5	3,5	2,25	3,5
15. V. „	59,5	33,25	0,75	2,75	2,0	1,75
18. V. „	58,75	33,0	0,75	2,25	3,0	2,0
20. V. „	59,75	35,0	0,25	2,0	2,5	1,0
23. V. „	56,0	33,5	1,0	3,25	3,0	3,25

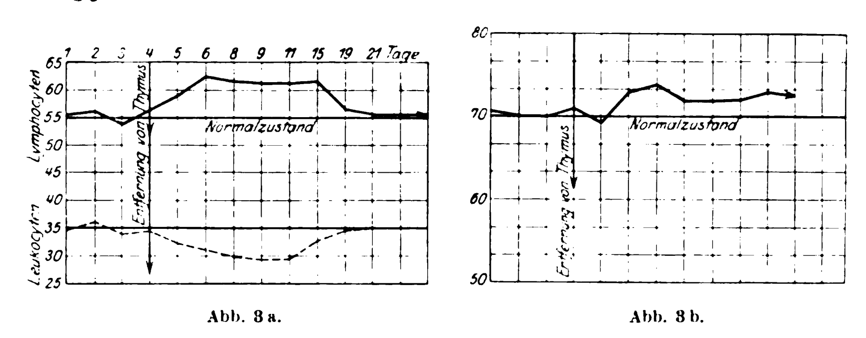


Abb. 8 a.

Abb. 8 b.

Tabelle IV.

Kaninchen grau.

Körpergewicht 2400 g. Normale Blutkörperchen.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Weiße Blutkörp.
22. II. 21	75	4 730 000,0	8 400,0
23. II. „	77	5 700 000,0	7 800,0
24. II. „	73	4 370 000,0	8 000,0
25. II. „	73	4 495 000,0	7 700,0
26. II. 21 Entfernung von Thymus.			
1. III. 21	76	5 200 000,0	10 000,0
2. III. „	70	3 570 000,0	9 900,0
4. III. „	73	4 450 000,0	9 800,0
5. III. „	73	4 575 000,0	8 700,0
7. III. „	75	4 855 000,0	8 900,0
11. III. „	73	4 425 000,0	9 600,0
15. III. „	74	4 625 000,0	10 100,0
17. III. „	73	4 465 000,0	9 700,0

Datum	Lymphoc.	Neutr.	Eosino.	Basophil.	Überg.	Monoc.
22. II. 21	59,25	31,0	1,0	3,25	2,0	3,5
23. II. „	60,75	33,25	0,75	1,25	2,25	1,75
24. II. „	55,25	39,0	1,0	2,0	1,0	1,75
25. II. „	58,0	38,25	0,75	0,75	1,0	1,25
26. II. 21 Entfernung von Thymus.						
1. III. 21	61,25	32,75	—	2,25	1,75	2,0
2. III. „	64,50	30,75	0,25	1,25	1,0	1,25
4. III. „	62,5	31,0	0,75	1,75	2,0	2,0
5. III. „	63,75	30,25	0,25	2,0	2,25	1,5
7. III. „	60,0	32,25	0,75	3,25	2,0	3,75
11. III. „	61,0	31,75	1,0	2,75	2,5	1,0
15. III. „	58,75	33,25	0,75	2,0	2,5	2,5
17. III. „	59,25	34,5	0,75	1,75	2,0	1,75

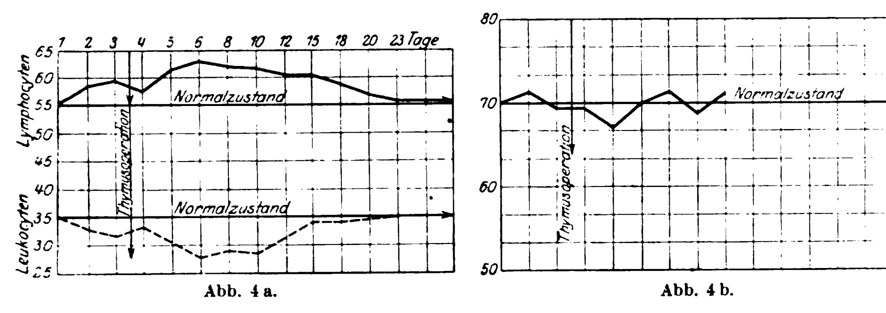


Abb. 4 a. Abb. 4 b.

Tabelle V. Kaninchen grau.

Körpergewicht 1700 g. Normaltiere.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Weiße Blutkörp.
11. XI. 20	72	4 325 000	8 000
13. XI. „	72	4 230 000	8 100
15. XI. „	70	4 100 000	9 600
16. XI. „	72	4 220 000	8 700
26. XI. 20 Entfernung von Thymus.			
29. XI. 20	72	4 100 000	7 800
1. XII. „	71	4 430 000	6 500
4. XII. „ . . .	70	4 200 000	10 100
4. XII. „	72	4 425 000	8 700
6. XII. „	73	4 625 000	9 600
11. XII. „	72	4 465 000	9 700
16. XII. „ . . .	72	4 230 000	10 100
18. XII. 20 Entfernung der Milz am früher enthymierten Tiere.			
25. XII. 20	73	4 345 000	9 400
27. XII. „	72	4 210 000	8 700
29. XII. „	75	5 425 000	9 200
30. XII. „	70	4 125 000	10 100
5. I. 21	74	4 830 000	9 700
7. I. „	73	4 525 000	9 100

Datum	Lymphoc.	Neutr.	Eosino.	Basophil.	Überg.	Monoc.
11. XI. 20	55,75	34,0	0,75	2,75	4,5	2,25
13. XI. „	57,75	32,75	0,5	2,5	3,75	2,75
15. XI. „	54,75	36,25	1,0	2,75	3,75	1,0
16. XI. „	60,25	31,75	0,75	2,0	2,25	3,0
26. XI. 20 Entfernung von Thymus.						
29. XI. 20	58,25	34,5	0,75	1,75	1,5	3,25
1. XII. „	56,75	35,75	0,5	2,75	3,0	1,25
4. XII. „	60,0	31,5	1,0	3,25	2,0	2,25
6. XII. „	62,75	30,75	0,75	4,5	1,0	0,75
11. XII. „	63,25	32,75	1,0	2,5	0,25	0,25
16. XII. „	60,5	31,25	0,5	3,25	2,75	1,75
20. XII. „	58,75	34,0	0,25	2,0		

22. XII. 20 Entfernung der Milz am früher exthymierten Tiere.

Datum	Lymphoc.	Neutr.	Eosino.	Basophil.	Überg.	Überg.
25. XII. 20	57,25	34,25	0,5	1,25	2,5	4,25
27. XII. „	59,25	30,5	1,5	2,0	3,75	3,0
29. XII. „	55,75	36,25	0,75	1,25	3,0	3,0
30. XII. „	60,75	32,0	1,5	2,25	1,25	2,25
5. I. 21	55,25	39,25	0,5	1,5	1,0	2,0
7. I. „	59,25	31,0	1,0	3,25	2,0	3,5
8. I. „	58,0	38,25	0,75	0,75	1,0	1,25
11. I. „	60,75	33,25	0,75	1,25	2,25	1,75

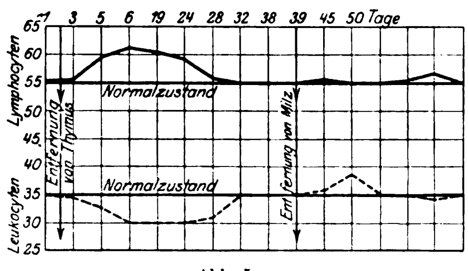


Abb. 5 a.

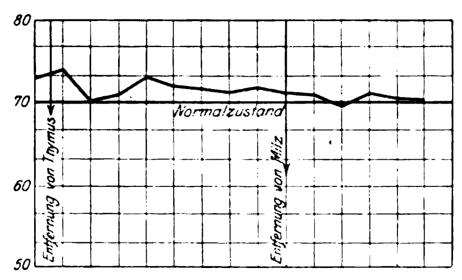


Abb. 5 b.

Tabelle VI. Kaninchen schwarz.

Körpergewicht 1800 g. Normaltiere.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Weiße Blutkörp.
21. III. 21	70	4 150 000	7 700
22. III. „	74	4 825 000	8 800
23. III. „	71	4 120 000	8 000
24. III. „	72	4 425 000	9 600
26. III. 21 Entfernung von Thymus.			
30. III. 21	70	4 150 000	9 000
1. IV. „	71	4 205 000	8 900
4. IV. „	73	4 930 000	10 200
7. IV. „	72	4 820 000	10 000
11. IV. „	70	4 130 000	9 800

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Weiße Blutkörp.
14. IV. 21	71	4 230 000	9 000
17. IV. „	72	4 625 000	12 000
19. IV. „	71	4 325 000	10 100
23. IV. „	71,5	4 240 000	9 100
27. IV. 21 Entfernung der Milz am früher exthymierten Tiere.			
27. IV. 21	70	4 225 000	8 800
29. IV. „	71	4 330 000	9 400
3. V. „	70	4 025 000	9 000
7. V. „	71	4 230 000	8 200
10. V. „	72	4 325 000	8 000
15. V. „	71	4 130 000	9 100

Datum	Lymphoc.	Neutr.	Eosino.	Basophil.	Überg.	Monoc.
21. III. 21	55,25	36,25	0,75	2,0	2,0	2,75
22. III. „	59,0	36,0	0,5	0,75	1,0	2,25
23. III. „	58,0	34,0	0,75	1,75	3,0	2,5
24. III. „	60,0	34,0	0,5	2,0	1,25	2,25
26. III. 21 Entfernung von Thymus.						
30. III. 21	58,75	33,75	0,5	3,0	2,5	1,5
1. IV. „	57,75	34,25	0,75	2,25	2,75	2,25
4. IV. „	59,5	32,25	1,0	2,5	1,75	3,0
7. IV. „	60,75	31,75	0,75	1,5	3,25	2,0
11. IV. „	61,25	30,25	0,5	2,75	2,5	2,75

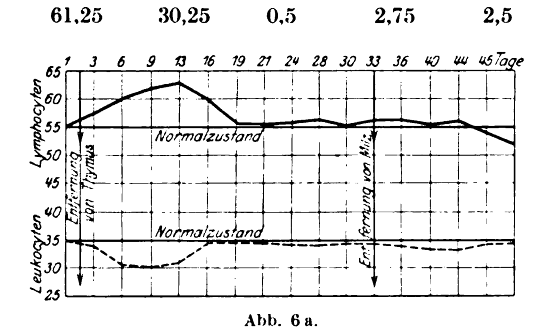


Abb. 6 a.

Abb. 6 b.

Datum	Lymphoc.	Neutr.	Eosino.	Basophil.	Überg.	Monoc.
14. IV. 21	62,5	32,75	0,25	1,5	2,0	2,0
17. IV. „	60,75	31,5	0,5	3,25	1,0	0,25
19. IV. „	58,5	36,75	0,75	1,75	1,25	1,0
23. IV. „	59,25	32,25	0,25	2,25	3,0	3,0
27. IV. 21 Entfernung der Milz am früher exthymierten Tiere.						
27. IV. 21	59,0	36,0	0,5	0,75	1,5	2,25
29. IV. „	55,25	39,75	0,5	1,5	1,0	2,0
3. V. „	57,25	34,25	0,5	1,25	2,5	4,25
7. V. „	58,0	38,0	0,75	1,0	1,0	1,25
10. V. „	60,0	34,0	0,75	1,25	2,25	1,75
15. V. „	61,0	33,0	—	2,25	2,0	1,75

Tabelle VII.

Kaninchen schwarz (jung).

Körpergewicht 2400 g. Normalzustand.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Weiße Blutkörp.
7. IV. 21	70	4 240 000	10 600
8. IV. „	70	4 120 000	9 000
11. IV. „	72	4 325 000	9 600
12. IV. „	74	4 652 000	8 900
13. IV. „	70	4 560 000	8 400
13. IV. 21 Blutentzug (aus rechter Carotis).			
14. IV. 21	64	3 715 000	10 900
15. IV. „	67	3 725 000	9 100
16. IV. „	69	4 540 000	12 000
18. IV. „	71	4 400 000	9 900
19. IV. „	71	4 230 000	8 300
20. IV. „	73	4 750 000	9 600
21. IV. „	72	4 430 000	7 600
21. IV. 21 Entfernung von beiden Thymuslappen.			
26. IV. 21	70	4 560 000	8 900
27. IV. „	73	4 675 000	8 000
28. IV. „	72	4 625 000	8 100
30. IV. „	74	5 250 000	9 600

Datum	Lymphoc.	Neutr.	Eosino.	Basophil.	Überg.	Monoc.	Myeloc.
7. IV. 21	60,25	34,0	0,75	1,0	2,0	2,0	—
8. IV. „	58,0	34,0	0,75	1,75	3,0	2,5	—
11. IV. „	59,25	36,25	—	1,0	2,5	1,0	—
12. IV. „	62,75	32,25	0,5	1,0	2,25	1,25	—
13. IV. „	55,25	37,75	0,25	1,5	2,5	2,75	—

13. IV. 21 Blutentzug (aus rechter Carotis).

Datum	Lymphoc.	Neutr.	Eosino.	Basophil.	Überg.	Monoc.	Myeloc.
14. IV. 21	53,25	40,5	0,5	1,25	2,25	2,25	—
15. IV. „	49,75	37,5	0,15	2,25	4,5	3,75	1,5
16. IV. „	48,75	43,25	0,25	1,5	3,0	2,25	1,0
18. IV. „	51,5	40,75	—	1,5	3,0	2,25	1,25
19. IV. „	63,0	30,5	0,5	1,25	2,25	1,75	0,75
20. IV. „	60,0	34,0	—	1,25	2,25	2,0	0,25
21. IV. „	60,95	32,0	0,75	2,25	3,25	1,0	—
			21. IV. 21 Entfernung von Thymus.				
26. IV. 21	54,75	39,0	0,5	1,5	2,75	1,5	—
27. IV. „	56,0	33,5	1,0	3,25	3,0	3,25	—
28. IV. „	58,0	33,5	0,5	2,75	3,75	1,5	—
30. IV. „	59,25	31,75	0,5	2,5	4,25	1,75	—

Schwarzfleck.

Körpergewicht 2400 g. 1. V. 21 Blutentzug.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Weiße Blutkörp.
1. V. 21	70	4 430 000	9 000
2. V. „	67	3 630 000	10 500
3. V. „	69	3 825 000	9 100
4. V. „	70	3 985 000	10 200
6. V. „	73	4 605 000	10 200
7. V. „	73	4 445 000	10 000
9. V. „	73	4 375 000	10 600

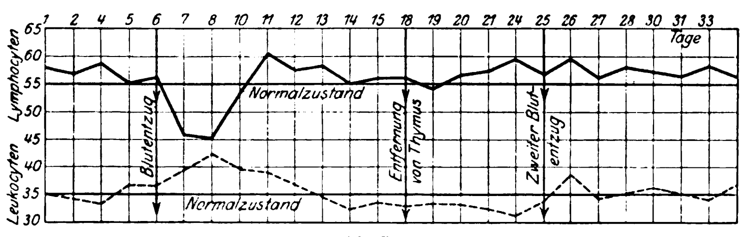


Abb. 7 a.

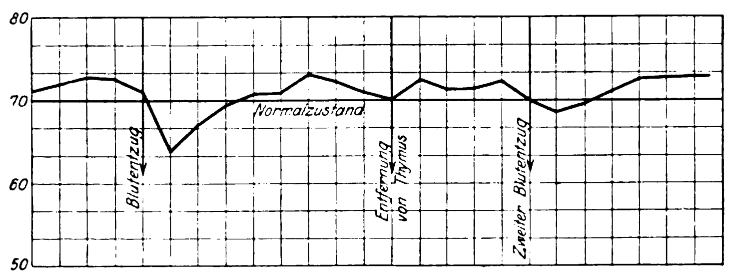


Abb. 7 b.

Körpergewicht 2400 g. 1. V. 21 Blutentzug. Thymuslos.

Datum	Lymphoc.	Neutr.	Eosino.	Basophil.	Überg.	Monoc.	Myeloc.
1. V. 21	60,5	31,0	1,25	2,25	2,25	2,75	–
2. V. „	53,5	39,25	0,5	1,75	2,0	2,75	0,75
3. V. „	57,75	33,5	0,75	1,25	3,0	2,0	1,5
4. V. „	56,25	35,5	0,5	2,25	2,75	2,5	20,25
6. V. „	53,75	37,5	1,0	1,5	3,0	3,25	–
7. V. „	59,5	34,0	0,5	1,5	2,5	2,0	–
9. V. „	53,5	38,5	0,5	1,75	3,25	2,5	–

Cyanwasserstoff. I.

Einfluß von Cyanwasserstoff auf Kontroll- und Versuchstiere.

Es ist bekannt, daß der Sauerstoffmangel ein Mittel ist, die blutbildenden Organe zu erregen. Dieser kann auf verschiedene Weise erzeugt werden. Hier wurde die experimentelle Dyspnöe durch das Cyan hervorgerufen. Ich wurde speziell auf dessen Verwendung geführt, weil sowohl Mansfeld als auch Sollberger sich seiner u. a. bedient haben. Durch die Blausäure wird der normale Gaswechsel im Körper zerstört. Das Blut, das die Capillaren passiert, gibt nicht wie sonst seinen Sauerstoff ab, sondern behält auch in den Venen je nach der zugeführten Dosis mehr oder weniger seine hellrote Farbe. Die Gewebe sind wahrscheinlich durch Fermentlähmung nicht mehr imstande, den Sauerstoff in normaler Weise aufzunehmen.

In Form von Acqua amygdalarum amarum kann Cyanwasserstoff genau dosiert werden, und deshalb wurde auch hier dieses Präparat benutzt. Acqua amygdalarum amarum enthält 0% HCN. Der Cyanwasserstoff wirkt auch auf das Knochenmark vorübergehend sauerstoffentziehend. Da nun einerseits der Bestand besonders der roten Blutkörperchen durch eine sehr feine Regulation ziemlich konstant erhalten wird, da der Untergang roter Blutkörperchen selber einen Reiz für das erythroplastische System darstellt, wir aber andererseits gesehen haben, daß sowohl die Milz als auch die Thymusdrüse einen Einfluß auf dieses System haben, erschien es interessant, den Sauerstoffmangel als Reiz zu benutzen, um so mehr als die Mansfeldsche Arbeit direkt den Angriffspunkt des Sauerstoffmangels für die Wirkung auf das Knochenmark in die Schilddrüse verlegt hatte.

Es ist aber vielleicht zunächst vorsichtiger, um nichts zu präjudizieren, die Fragestellung neutraler zu fassen und sie in folgender Weise zu stellen: Wie reagiert das Blutbild eines normalen Tieres, eines thymuslosen, eines milzlosen und eines doppeltoperierten Tieres auf geringe Mengen Cyanwasserstoff?

Wie schon oben erwähnt, wurde Acqua amygdalarum amarum benutzt.

Tabelle I. Kaninchen, silberfarbig.

Körpergewicht 1800 g Normaltiere.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Weiße Blutkörp.
25. IV. 21	70	4 130 000	9 800
27. IV. „	71	4 330 000	9 000

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Weiße Blutkörp.
29. IV. 21	70	4 205 000	8 700
30. IV. „	72	4 430 000	10 000
9. V. „	Injektion von 1 mg HCN		
	5 Stunden nach der Injektion		
	55	2 060 000	13 000
	10 Stunden nach der Injektion		
	60	2 700 000	12 000
	30 Stunden nach der Injektion		
	65	3 005 000	10 700
	60 Stunden nach der Injektion		
	70	4 005 000	10 000
	Nach 3 Tagen		
12. V. 21	71	4 230 000	8 500
15. V. „	70	4 125 000	9 100

Datum	Lymphoc.	Neutr.	Eosino.	Basophil.	Überg.	Monoc.
26. IV. 21	57,75	32,75	0,75	2,25	2,75	3,75
27. IV. „	58,75	35,25	—	1,5	1,75	2,75
29. IV. „	59,0	37,0	0,75	1,25	1,0	1,0
30. IV. „	58,5	33,25	0,5	2,25	3,25	2,25
9. V. „	Injektion von 1 mg HCN					
	5 Stunden nach der Injektion					
	42,25	49,5	0,5	1,5	2,0	4,25
	10 Stunden nach der Injektion					
	43,0	47,25	0,25	1,5	4,0	4,0
	30 Stunden nach der Injektion					
	47,0	43,75	0,75	2,0	3,5	3,0
	60 Stunden nach der Injektion					
	55,75	36,25	0,5	1,5	3,5	2,5
	Nach 3 Tagen					
12. V. „	58,25	36,5	0,5	1,5	1,0	2,5
15. V. „	57,25	35,25	0,5	2,5	2,0	2,5

Abb. 8 a.

Abb. 8 b.

Tabelle II.

Normalkaninchen.

Körpergewicht 2200 g. Normalkaninchen.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Weiße Blutkörp.
3. II. 21	74	4 640 000	8 000
5. II. „	73	4 400 000	11 000
8. II. „	75	4 825 000	8 000
9. II. „	75	4 775 000	9 800
	Injektion von 1 mg HCN		
	5 Stunden nach der Injektion		
	62	3 645 000	10 500
	10 Stunden nach der Injektion		
	66	3 850 000	9 900
	30 Stunden nach der Injektion		
	71	4 225 000	10 200
	60 Stunden nach der Injektion		
	73	4 521 500	10 000
	5 Tage nach der Injektion		
	73	4 400 000	8 600
	8 Tage nach der Injektion		
	72	4 235 000	10 200

Datum	Lymphoc.	Neutr.	Eosino.	Basophil.	Überg.	Monoc.
3. II. 21	59,25	31,0	0,75	4,25	1,75	3,0
3. II. „	60,25	31,5	0,25	2,0	4,0	2,0
8. II. „	57,25	34,75	1,0	1,75	3,25	2,0
9. II. „	58,0	34,0	5,0	2,75	3,75	1,0
		Injektion von 1 mg HCN				
		5 Stunden nach der Injektion				
	52,25	39,75	0,75	2,25	2,25	2,75
		10 Stunden nach der Injektion				
	58,25	33,75	0,25	3,0	2,0	2,75
		30 Stunden nach der Injektion				
	59,0	32,5	0,5	2,5	3,5	2,0
		60 Stunden nach der Injektion				
	58,25	32,75	0,5	1,75	3,5	3,25
		5 Tage nach der Injektion				
14. II. 21	60,25	32,0	0,25	1,75	3,0	2,75
17. II. „	59,75	32,75	—	3,25	1,75	2,5

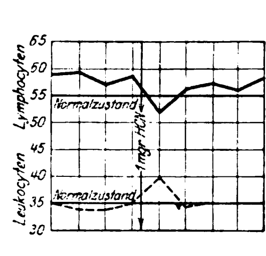


Abb. 9 a.

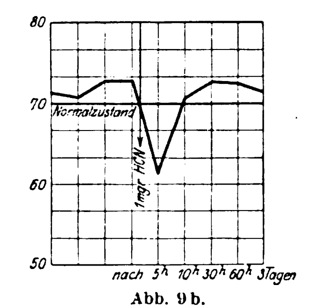


Abb. 9 b.

Tabelle III.

Kaninchen, grau.

Körpergewicht 2400 g. Thymuslos.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Weiße Blutkörp.
7. III. 21	75	4 835 000	8 900
11. III. „	73	4 425 000	9 600
15. III. „	74	4 625 000	10 100
17. III. „	73	4 465 000	9 700
	Injektion von 1 mg HCN		
	5 Stunden nach der Injektion		
	70	4 005 000	12 000
	10 Stunden nach der Injektion		
	72	4 170 000	10 100
	30 Stunden nach der Injektion		
	74	4 625 000	8 000
	60 Stunden nach der Injektion		
	72	4 250 000	8 800
	5 Tage nach der Injektion		
22. III. 21	75	4 820 000	7 700
24. III. „	74	4 700 000	7 900
26. III. „	75	4 950 000	8 500
29. III. „	74	4 780 000	9 500
31. III. „	75	4 850 000	8 700

Datum	Lymphoc.	Neutr.	Eosino.	Basophil.	Überg.	Monoc.
7. III. 21	60,0	32,25	0,75	3,25	2,0	3,75
11. III. „	61,0	31,75	1,0	2,75	2,5	1,0
15. III. „	58,75	33,25	0,75	2,0	2,5	2,5
17. III. „	59,25	34,5	0,75	1,75	2,0	1,75
	Injektion von 1 mg HCN					
	5 Stunden nach der Injektion					
	58,0	36,75	0,25	1,5	1,25	2,25
	10 Stunden nach der Injektion					
	58,75	32,25	0,75	2,25	2,50	3,5

Datum	Lymphoc.	Neutr.	Eosino.	Basophil.	Überg.	Monoc.
		30 Stunden nach der Injektion				
	62,0	33,25	1,0	2,5	0,5	1,0
		60 Stunden nach der Injektion				
	61,25	30,25	0,5	1,25	3,75	3,0
		5 Tage nach der Injektion				
22. III. 21	63,25	30,0	0,75	1,5	2,25	2,25
24. III. „	62,25	27,75	0,5	2,0	3,5	4,0
26. III. „	55,75	36,25	0,75	1,25	3,0	3,0
29. III. „	61,0	32,75	0,75	1,25	2,25	2,0
31. III. „	59,25	30,5	1,5	2,0	3,75	3,0

Abb. 10 a.

Abb. 10 b.

Tabelle IV.

Kaninchen, grau.

Körpergewicht 2100 g. Thymuslos.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Weiße Blutkörp.
11. V. 21	72	4 525 000	9 200
15. V. „	73	4 825 000	9 800
18. V. „	72	4 435 000	10 100
20. V. „	73	4 830 000	9 010
23. V. „	74	5 130 000	8 600
25. V. „		Injektion von 1 mg HCN	
	5 Stunden nach der Injektion		
	67	4 205 000	12 000
	10 Stunden nach der Injektion		
	70	4 330 000	10 100
	30 Stunden nach der Injektion		
	73	4 940 000	8 700
	60 Stunden nach der Injektion		
	75	5 010 000	8 400
		Nach 3 Tagen	
28. V. 21	73	4 430 000	9 200
29. V. „	72	4 120 000	9 000
7. VI. „	73	4 525 000	9 800

Datum	Lymphoc.	Neutr.	Eosino.	Basophil.	Überg.	Monoc.
11. V. 21	60,0	32,25	0,5	3,5	2,25	3,5
15. V. „	59,5	33,25	0,75	2,75	2,0	1,75
18. V. „	58,75	33,0	0,75	2,25	3,0	2,0
20. V. „	59,75	35,0	0,25	2,0	2,5	1,0
23. V. „	56,0	33,5	0,1	3,25	3,0	3,25
25. V. „			Injektion von 1 mg HCN			
			5 Stunden nach der Injektion			
	56,25	35,75	0,5	2,5	2,75	2,25
			10 Stunden nach der Injektion			
	58,75	32,25	0,75	3,0	2,25	4,0
			30 Stunden nach der Injektion			
	59,5	32,0	0,5	3,5	2,5	2,0
			60 Stunden nach der Injektion			
	57,75	33,25	0,5	2,75	2,5	3,25
			Nach 3 Tagen			
28. V. 21	60,75	31,5	0,25	2,75	2,0	2,75
29. V. „	59,25	32,75	0,5	3,75	1,25	2,5
7. VI. „	59,25	31,0	0,75	4,25	1,75	3,0

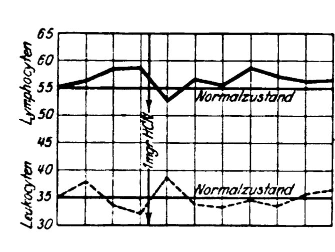


Abb. 11 a.

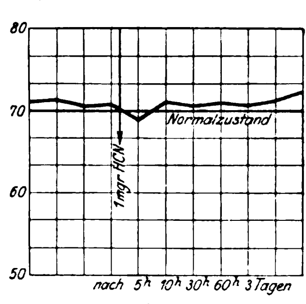


Abb. 11 b.

Tabelle V.

Kaninchen, grau.

Körpergewicht 1950 g. Milzlose und exthymierte Tiere.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Weiße Blutkörp.
26. IV. 21	70	4 430 000	12 000
27. IV. „	71	4 125 000	11 800
28. IV. „	69	4 130 000	9 600
29. IV. „	71	4 400 000	9 900
30. IV. „		Injektion von 1 mg HCN	
		5 Stunden nach der Injektion	
	70	4 225 000	8 900
		10 Stunden nach der Injektion	
	70	4 120 000	9 600

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Weiße Blutkörp.
	30 Stunden nach der Injektion		
	72	4 430 000	9 500
	60 Stunden nach der Injektion		
	73	4 640 000	9 800
	Nach 3 Tagen		
3. IV. 21	73	4 325 000	9 700
4. IV. „	72	4 120 000	10 100
7. IV. „	73	4 825 000	9 600

Datum	Lymphoc.	Neutr.	Eosino.	Basophil.	Überg.	Monoc.
26. IV. 21	54,75	35,75	0,75	2,25	2,75	3,75
27. IV. „	58,0	34,0	0,75	1,75	3,0	2,5
28. IV. „	55,75	38,25	—	1,5	1,75	2,75
29. IV. „	57,5	37,0	0,5	2,0	1,5	1,5
30. IV. „	Injektion von 1 mg HCN					
	5 Stunden nach der Injektion					
	55,25	36,0	0,75	2,0	3,25	2,75
	10 Stunden nach der Injektion					
	56,0	35,0	1,0	2,0	3,25	2,75
	30 Stunden nach der Injektion					
	57,0	35,25	0,75	1,75	2,25	3,0
	60 Stunden nach der Injektion					
	55,0	36,0	0,75	2,5	4,25	1,5
	Nach 3 Tagen					
3. V. 21	60,0	34,0	0,75	1,0	2,25	2,0
4. V. „	57,5	35,0	0,25	1,5	2,25	1,5
5. V. „	58,0	38,25	0,75	0,75	1,0	1,75

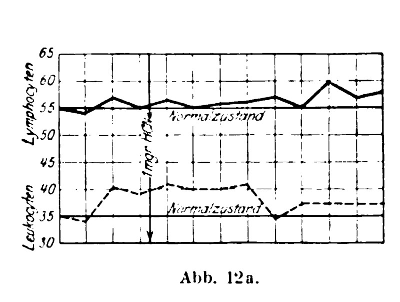


Abb. 12a.

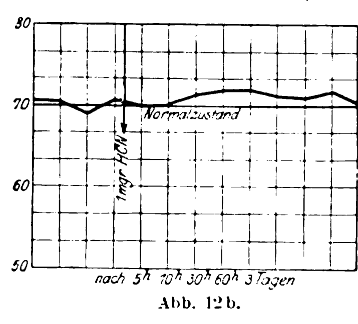


Abb. 12b.

Tabelle VI. Kaninchen, schwarz.

Körpergewicht 1800 g. Milzlose und exthymierte Tiere.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Weiße Blutkörp.
7. V. 21	71	4 230 000	8 200
10. V. „	72	4 325 000	8 000

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Weiße Blutkörp.
15. V. „	71	4 130 000	9 100
20. V. „	Injektion von 1 mg HCN		
	5 Stunden nach der Injektion		
	70	4 225 000	8 900
	10 Stunden nach der Injektion		
	71	4 310 000	9 600
	30 Stunden nach der Injektion		
	72	4 825 000	8 000
	60 Stunden nach der Injektion		
	72	4 405 000	8 700
	Nach 3 Tagen		
23. V. 21	72	4 640 000	9 000
25. V. „	71	4 330 000	9 600
27. V. „	71	4 130 000	10 100

Datum	Lymphoc.	Neutr.	Eosino.	Basophil.	Überg.	Monoc.
7. V. 21	58,0	38,0	0,75	1,0	1,0	1,25
10. V. „	60,0	34,0	0,75	1,25	2,25	1,75
15. V. „	61,0	33,0	—	2,25	2,0	1,75
20. V. „	Injektion von 1 mg HcN					
	5 Stunden nach der Injektion					
	57,75	37,25	0,75	2,25	1,25	0,75
	10 Stunden nach der Injektion					
	59,25	34,5	0,5	3,0	1,75	1,0
	30 Stunden nach der Injektion					
	58,75	33,0	1,0	2,0	2,75	2,5
	60 Stunden nach der Injektion					
	60,0	35,75	0,75	1,5	1,0	1,0
	Nach 3 Tagen					
23. V. 21	59,25	34,25	0,75	1,75	2,0	2,0
25. V. „	57,5	36,0	0,75	2,0	1,75	3,0
27. V. „	58,75	37,0	0,5	0,75	1,5	1,5

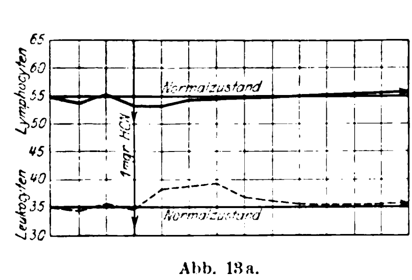


Abb. 13a.

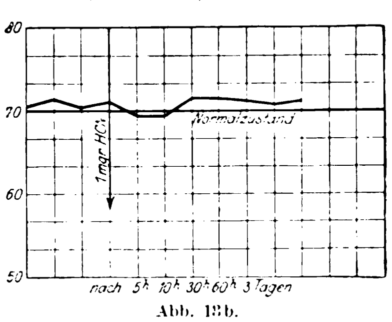


Abb. 13b.

Literatur.

Asher und Dubois, diese Zeitschr. **82**. — Asher und Hermann Messerli, diese Zeitschr. **97**, 1 u. 2. — Waser, Alois, Zeitschr. f. Biol. **71**. — Aschoff, Pathologische Anatomie, 1919, S. 180. — Biedl, Arthur, Physiologie der Thymus (innere Sekretion). 2. u. 3. Aufl. — Friedleben, Die Physiologie der Thymusdrüse in Gesundheit und Krankheit vom Standpunkte experimenteller und klinischer Erforschung. — Krause, Die Anatomie des Kaninchens, Leipzig. — Klose und Vogt, Klinik und Biologie der Thymusdrüse. Bruns Beitr. z. klin. Chirurg. **69**. 1910. — Fischer, Experimentelle Beiträge zur Frage der Bedeutung der Thymusexstirpation bei jungen Tieren. — Matti, Mitt. a. d. Grenzgeb. d. Med. u. Chirurg. **24**. 1912. — Matti, Die Altersveränderung der Thymusdrüse beim Kaninchen. Arch. f. mikroskop. Anat. **73**. 1909. Zit. — Naegeli, Blutkrankheiten und Blutdiagnostik 1919. — Sahli, Klinische Untersuchungsmethode. — Söderlund und Backmann, Studien über die Thymusinvolution. — Weidenreich, Die Leukocyten und verwandte Zellformen. — Tongu, Über die Funktionen der Thymusdrüse vom Standpunkte ihrer Ausfallserscheinungen. Mitt. a. d. med. Fak. d. kais. Univ. zu Tokio **15**, H. 3. 1917. — Tongu, Beiträge zum Exstirpationsversuch der Thymus bei Hunden. Mitt. a. d. med. Fak. d. kais. Univ. zu Tokio **17**, H. 3. 1919.

Über die Einwirkung von Metallen auf Sera.

I. Serumfällung durch Metalle.

II. Komplement und Metallwirkung.

III. Keimtötung im Serum. (Ein chemotherapeutischer Versuch.)

Von

Leo Hess und Rudolf Reitler.

(Aus der III. Medizinischen Klinik der Universität in Wien.)

(Eingegangen am 10. Juli 1921.)

I.

Werden Aufschwemmungen von roten Blutkörperchen in geeigneter Konzentration in isotonische Kochsalzlösungen, welche vorher durch bestimmte Zeit mit Metallen in Kontakt gestanden waren, eingetragen, so erfolgt Hämolyse, deren Bedingungen und Gesetzmäßigkeiten in einer vorhergehenden Mitteilung[1]) erörtert wurden. Werden die Erythrocyten statt in Kochsalzlösung in Serum suspendiert, so hemmt dieses die Hämolyse, ebenso bleibt dieselbe aus, wenn nicht „Metall-Kochsalzlösung", sondern „Metall-Serum" zur Suspension verwendet wird. Bei der letztgenannten Versuchsanordnung konnten Fällungen des Serums durch das Metall festgestellt werden, deren Bedingungen nachzugehen uns von Interesse erschien, da wir in ihnen den Schlüssel für die Erklärung der erwähnten Hemmung der Hämolyse vermuteten. Inzwischen haben diese Studien weitere interessante Befunde ergeben, die aus 2 Gründen der Mitteilung wert sein mögen: Fürs erste ergab sich eine Ausfällbarkeit von Serumeiweiß mit Hilfe von blanken Metallen, die ganz eigenartigen Gesetzen folgt. Diese physikalisch-chemische Zustandsänderung des Serums durch Metalle dürfte,

[1]) L. Hess und R. Reitler, Über Hämolyse durch oligodynamische Metallwirkung. Med. Klin. 1920, Nr. 38.

wie wir im folgenden zeigen werden, von Bedeutung sein für unsere Auffassung des Komplements frischer Sera. Endlich haben uns diese Experimente einen Weg zur therapeutischen Anwendung der oligodynamischen Metallwirkung gewiesen, der bisher nicht beschritten wurde und der, soweit unsere Eprouvettenversuche einen Schluß gestatten, aussichtsreich erscheint.

Das Mengenverhältnis zwischen Serum und Metall betrug stets 1 ccm Serum auf 1 qcm Metalloberfläche. Bei den im folgenden mitgeteilten Versuchen wurde als Paradigma für die Fällung durch Metalle Kupfer verwendet, jedoch stehen uns analog verlaufende Kontrollversuche mit anderen Metallen zur Verfügung.

Blanke Metallstreifen unter aseptischen Bedingungen in unverdünntes natives Serum gebracht, rufen nach einigen Tagen bei Null Grad oder Zimmertemperatur Niederschläge hervor. Die Niederschläge sind von weißlicher Farbe, grobflockig und haften an der Metalloberfläche, in Lipoidlösungsmitteln sind sie unlöslich. Bei längerem Stehen steigert sich die Menge des Niederschlages, schließlich tritt überdies infolge von Bildung des löslichen Kupferalbuminates eine grünliche Verfärbung der ganzen Flüssigkeit auf. Der Versuch, statt mit konzentriertem mit verdünntem Serum angestellt, ergibt ein überraschendes Resultat. Es erfolgt in den verdünnten Seris die Ausfällung rascher als in den unverdünnten, bei höhergradiger Verdünnung (5—10%) makroskopisch schon nach wenigen Minuten, während die Ausfällung höher konzentrierter Sera längere Zeit erfordert. Dabei verdient hervorgehoben zu werden, daß kein strenger Parallelismus zwischen Serumkonzentration und der zur Ausfällung notwendigen Zeit besteht, da stark verdünnte Sera unverhältnismäßig rascher ausgefällt werden als konzentriertere. Als Beispiel diene folgender Versuch:

Menschliches Serum wird zu 10%, 15%, 20% usw. mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt, mit Kupfer versetzt und im Eisschrank stehengelassen; nach 2 Stunden beobachtet man Ausfällungen bloß bei 10 und 15%, nach 24 Stunden ist die Fällung bis zu 30% Verdünnung vorgeschritten. Die Grünfärbung durch Kupferalbuminat tritt auch bei verdünnten Seris erst nach einigen Tagen auf. — Die besprochenen Niederschläge werden nur beobachtet bei Kontakt des blanken Metalls mit dem Serum;

„Kupferwasser", d. h. mit Kupfer vorbehandelte NaCl-Lösung erzeugt auch im stark verdünnten Serum keine Fällung. — Durch mikroskopische Beobachtung des Fällungsvorganges konnten wir uns überzeugen, daß die Fällung bei niedrigerer Konzentration augenblicklich eintritt, wobei der Niederschlag selbst kompakter erscheint bei Verwendung von etwas höherer Serumkonzentration, während verdünntere Sera lockerer ausfallen. Diese Beobachtung erscheint uns deshalb nicht unwichtig, weil sie die oben erwähnte langsamere Fällung höherer Serumkonzentrationen verständlich macht. — Oxydiertes Kupfer bewirkt weder makroskopisch noch mikroskopisch nachweisbare Fällung.

Unterwirft man Sera in verschiedenen Konzentrationen der Metallwirkung, so zeigt sich, daß unter sonst gleichen Bedingungen die Fällungsgrenze frischer Sera bei höheren Konzentrationen gelegen ist als diejenige älterer Sera. Die Fällbarkeit geht also bei längerem Stehen des Serums zurück. Die Versuche wurden derart angestellt, daß menschliches Serum, steril aufbewahrt, an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen in einer von 5 zu 5 steigenden Konzentrationsreihe der Metallfällung unterworfen wurde. Dabei ergab sich, daß die mit der Zeit eintretende Abnahme der Fällbarkeit von der Konzentration, in welcher das Serum aufbewahrt wurde, unabhängig ist.

Versuch: Menschliches Serum wird A. konzentriert, B. in 50proz. Verdünnung steril im Eisschrank aufbewahrt und an 4 aufeinanderfolgenden Tagen ausgefällt. Ablesen nach 24 Stunden Eisschrank.

A.	12	36	60	84	Stunden nach Entnahme d. Serums
Höchste fällb. Konzentration in Proz.	20	20	15	15	
B.	12	36	60	84	Stunden nach Entnahme d. Serums
Höchste fällb. Konzentration in Proz.	40	40	30	30	

Die Fällungsgrenze des frischen Serums und der Rückgang der Fällbarkeit nach längerem Stehen variieren individuell. Für die erstere mag der Eiweißgehalt des Serums von Bedeutung sein, der letztere ist, wie der eben erwähnte Versuch lehrt, hiervon unabhängig.

Unsere Beobachtungen über die maximale Fällbarkeit des Serums verschiedener Kranker und deren Rückgang ergaben folgende Zahlen:

Nummer	Diagnose	Höchste nach 12 Stdn. Eisschrank noch ausgefällte Serumkonzentration 12 Stdn.	80 Stdn.
		nach Entnahme	
1.	inkomp. Vit. cordis	20%	15%
2.	„ „ „	20 „	15 „
3.	Ca ventriculi	40 „	30 „
4.	Neurasthenie	20 „	—
5.	Ca ventr.	40 „	30 „
6.	Aneurysma aortae	15 „	—
7.	Gonorrhöe	20 „	15 „
8.	Trigem. Neuralgie	20 „	—
9.	Subphr. Absceß	15 „	—
10.	Ca pancreatis	30 „	25 „
11.	inkomp. Vit. cordis	20 „	—
12.	Scleros. multipl.	15 „	—
13.	Ulc. ventr. (Ca?)	25 „	15 „
14.	Gesund	20 „	—
15.	Enterit. ulcer. (Ca recti?)	35 „	—
16.	Alte Hemiplegie	15 „	—
17.	kardiale Insuff. (Stauung)	25 „	—
18.	Neurose	20 „	15 „
19.	Poliomyelit. ant. acut.	20 „	—
20.	Ca vesic. felleae	30 „	—
21.	Vit. cordis	20 „	10 „
22.	Cirrhos. hepatis	15 „	—
23.	Vit. cord. (subfebril)	10 „	—
24.	Nephritis (leicht. Ödem)	20 „	15 „
25.	Hochgrad. kard. Stauung	20 „	15 „
26.	Apicitis, Lues latens	20 „	10 „
27.	Kard. Insuff. hochgrad. Stauung	15 „	—

Ein Urteil über eine diagnostische Verwertbarkeit dieser Untersuchungsmethode kann wohl erst aus einer großen Zahl von Untersuchungen gewonnen werden, nachdem vorerst der Einfluß physiologischer Vorgänge auf das Verhalten des Serums in der in Rede stehenden Beziehung festgestellt worden ist. Doch wäre eine solche Verwertbarkeit — der absoluten Fällungsgrenze im Zusammenhalt mit dem jeweiligen Eiweißgehalt des Serums oder des Rückganges der Fällbarkeit für sich allein — a priori nicht unwahrscheinlich. Jedenfalls ist die deutlich erhöhte Fällbarkeit des Serums Carcinomatöser bemerkenswert und fordert zu weiteren Untersuchungen nach dieser Richtung hin auf.

II.

Es erhebt sich nun die Frage nach dem Grund der Abnahme der Fällbarkeit bei längerem Stehen des Serums. Die einzig bekannte Veränderung, welche Sera schon bald nach ihrer Gewinnung erleiden, ist die Verminderung resp. der Verlust ihrer komplettierenden Fähigkeit bei Immunitätsversuchen. Wir sahen uns daher veranlaßt, native, komplementhaltige und inaktivierte, durch halbstündiges Erwärmen auf 56° ihres Komplements beraubte Sera hinsichtlich ihrer Fällbarkeit miteinander zu vergleichen.

A. Menschliches Serum wird sofort nach der Entnahme zum Teil inaktiviert, zum Teil aktiv in steigenden Konzentrationen wie oben der Fällung unterworfen. Ablesen nach 2 und 24 Stunden Eisschrank.

		2 Stdn.	24 Stdn. Kontaktdauer
Fällungsgrenze	aktiv	15%	30%
„	inaktiv	15 „	25 „

B. Versuchsanordnung wie oben. Die Differenz in den Serumkonzentrationen beträgt jedoch bloß 1%. Ablesen nach 24 Stunden Eisschrank.

Fällungsgrenze	aktiv	32%
„	inaktiv	25 „

Inaktivierte Sera sind somit schwerer fällbar als aktive. Am klarsten tritt dieser Unterschied zutage, wenn die Kontaktdauer zwischen Serum und Metallwasser etwa 24 Stunden beträgt. Nach 48stündigem Kontakt ist der Unterschied wieder verschwunden, wie folgender Versuch zeigt:

Versuchsanordnung wie oben, jedoch längere Kontaktdauer.

		Kontaktdauer			
		12 Stdn.	24 Stdn.	36 Stdn.	48 Stdn.
Fällungsgrenze	aktiv	20%	20%	25%	25%
„	inaktiv	15 „	15 „	20 „	25 „

Eine Bedingung für die Abnahme der Fällbarkeit des Serums bei längerem Stehen ist daher in dem Verschwinden des Komplements zu suchen; daß aber außerdem noch andere Faktoren mitspielen, beweist der Umstand, daß auch inaktives Serum bei längerem Stehen in seiner Fällbarkeit zurückgeht.

A. Aktives Serum wird 1. eine Stunde, 2. 24 Stunden, 3. 48 Stunden nach Entnahme in üblicher Weise der Fällung

unterworfen. Ablesung nach 12, 24, 36 Stunden Eisschrank. Die Fällungsgrenze beträgt:

	12 Stdn.	24 Stdn.	36 Stdn.
1 Stunde nach Entnahme	20%	25%	35%
24 Stunden „ „	15 „	20 „	35 „
48 „ „ „	10 „	20 „	25 „

B. Ein Teil desselben Serums inaktiviert wird analog behandelt. Hierbei beträgt die Fällungsgrenze:

		Kontaktdauer	
	12 Stdn.	24 Stdn.	36 Stdn.
1 Stunde nach Entnahme	20%	20%	30%
24 Stunden „ „	15 „	20 „	30 „
48 „ „ „	10 „	20 „	25 „

Weiter geht aus diesem Versuch hervor, daß der Unterschied zwischen aktivem und inaktivem Serum um so früher auftritt, je frischer das Serum ist und nach 48 Stunden gänzlich schwindet.

In den vorstehenden Versuchen wurde stillschweigend die Annahme gemacht, daß die einzige derzeit nachweisbare Veränderung, welche Sera durch Stehenlassen unter aseptischen Bedingungen, sowie durch das Erwärmen auf 56° erleiden, im Verschwinden des sog. Komplements bestehe und daher die Abnahme der Fällbarkeit der Sera durch Metalle nach längerem Stehen oder Erwärmen mit diesem Komplementverlust in Beziehung gebracht werden müsse. Eine Stütze für diese Annahme scheint uns folgende Versuchsanordnung zu bieten: Der Zusatz einer geringen Menge von frischem, komplementfreiem Serum (Meerschweinchen) zu inaktiviertem Menschenserum verbürgt die Gegenwart von Komplement, ohne den Eiweißgehalt wesentlich zu verändern. Würde unserer bisherigen Annahme entsprechend zwischen Fällbarkeit und Komplementgehalt des Serums ein Konnex bestehen, so würde der eben erwähnte Zusatz die Fällbarkeit des inaktiven Serums steigern müssen. Der folgende Versuch bestätigt diese Voraussetzung:

Frisch gewonnenes Menschenserum wird zum Teil inaktiv, zum Teil aktiv belassen, einer dritten inaktiven Portion wird 2% frisches Meerschweinchenserum zugesetzt, jede Portion wird nun wie üblich der Fällung unterworfen. Ablesung nach 24 Stunden Eisschrank.

Letzte Fällung bei: 34% aktiv,
27 „ inaktiv,
29 „ reaktiviert.

Daß die durch Zusatz von 2% Meerschweinchenserum bewirkte geringfügige Veränderung des Eiweißgehaltes nicht maßgebend ist für die Änderung der Fällbarkeit, lehrt der Kontrollversuch, in welchem unter sonst gleichen Bedingungen der Zusatz von 2% inaktivem Meerschweinchenserum zum gleichen inaktiven Menschenserum keine Änderung der Fällbarkeit hervorrief.

Letzte Fällung bei: 34% aktiv,
26 „ inaktiv,
26 „ inaktiv + inaktivem Meerschweinchenserum,
30 „ reaktiviert.

Wir glauben uns somit zu dem Schlusse berechtigt:

Der bisher nur im biologischen Versuch zutage tretende Unterschied zwischen nativem und erwärmtem oder stehengelassenem Serum, das sog. Komplement, hat sein physikalisch-chemisches Seitenstück im differenten Verhalten gegenüber der fällenden Wirkung blanker Metalle. Komplementhaltige Sera sind leichter fällbar als komplementfreie.

In dem vorhergehenden Abschnitt wurde gezeigt, daß die Niederschlagsbildung durch blankes Metall in komplementhaltigem Serum bei gleicher Kontaktdauer bis zu höheren Konzentrationsgraden fortschreitet als in komplementfreiem. Es fällt somit dem Komplement eine gewisse Rolle bei der Ausfällung zu, sei es, daß die Fällung im allgemeinen begünstigt, sei es, daß die Differenz der Fällungsgrenzen zwischen aktivem und inaktivem Serum durch ausgefälltes Komplement selbst hervorgerufen wird. In beiden Fällen muß eine innigere Beziehung zwischen Komplement und Metall angenommen werden, und es entsteht die Frage, ob bei Bestehen einer solchen Beziehung die komplettierende Eigenschaft des aktiven Serums in irgendeiner Weise beeinflußt werde. Zur Erörterung dieses Problems wäre ein doppelter Weg möglich gewesen: Es konnten blanke Metallstreifen mit dem zu prüfenden Serum stehengelassen und dieses sodann auf seine komplettierende Fähigkeit geprüft werden; oder aber war aktives

Serum in abgestufter Konzentration mit Kochsalzlösung, welche mit Kupfer vorbehandelt worden war, zu mischen und hierauf die in Rede stehende Auswertung durchzuführen. Wir wählten die letztere Alternative, da bei der erstgenannten Versuchsordnung quantitativ unkontrollierbare Serumveränderungen verschiedener Art (Änderungen des Eiweißgehaltes usw.) infolge der beschriebenen Fällung den Versuch beeinträchtigt hätten, während die Mischung von Serum mit Kupfer-Kochsalzlösung, wie erwähnt, keinen Niederschlag gibt. Die Kupfer-Kochsalzlösung war stets derart hergestellt, daß 1 ccm Flüssigkeit auf 1 qcm Kupferoberfläche 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen worden war.

1. Komplement wird 1: 20 mit Kupferwasser verdünnt durch 6 Stunden stehengelassen, sodann zu einem hämolytischen System mit fallenden Komplementmengen aufgefüllt. Zur Vermeidung der Kupferhämolyse, welche übrigens stets erst nach mehrstündiger Latenzzeit eintritt, wird überall gleichviel inaktiviertes Pferdeserum zugesetzt. Schließlich wird zur Herstellung vollständig gleicher Bedingungen überall die entsprechende Menge NaCl-Lösung hinzugefügt. Ablesung nach 1/4 Stunde Brutschrank.

Gekupfertes Meerschweinchenserum	Lysis
0,1 ccm	komplett
0,08 „	„
0,06 „	„
0,04 „	„
0,02 „	inkomplett

Natives Meerschweinchenserum	Lysis
0,1 ccm	komplett
0,08 „	„
0,06 „	„
0,04 „	„
0,02 „	„

2. Komplement wird 1: 50 mit Kupferwasser verdünnt und in gleicher Weise behandelt. Ablesung nach 2 Stunden Brutschrank.

Gekupfertes Meerschweinchenserum	Lysis
0,14 ccm	komplett
0,12 „	„
0.10 „	„
0,08 „	„
0,06 „	„
0,04 „	„
0,02 „	inkomplett
0,01 „	kompett
0,005 „	0

Natives Meerschweinchenserum	Lysis
0,14 ccm	komplett
0,12 „	„
0,10 „	„
0,08 „	„
0,06 „	„
0,04 „	„
0,02 „	„
0,01 „	„
0,005 „	inkomplett
0,0025 ccm	„
0,0013 „	0

3. Komplement wird 1 : 100 mit Kupferwasser verdünnt und in gleicher Weise behandelt. Ablesung nach 2 Stunden Brutschrank.

Gekupfertes Meerschweinchenserum	Lysis
0,05 ccm	0
0,04 „	0
0,03 „	0
0,02 „	0
0,01 „	0
0,005 „	0
0,0025 „	0

Natives Meerschweinchenserum	Lysis
0,05 ccm	komplett
0,04 „	„
0,03 „	„
0,02 „	„
0,01 „	„
0,005 „	„
0,0025 ccm	„
0,001 „	inkomplett
0,0005 „	Spuren
0,00025 „	0

4. Komplement wird mit Kupferwasser 1 : 100 verdünnt, geschüttelt und sofort mit Erythrocyten und Amboceptor in den üblichen Mengenverhältnissen versetzt und durch 2 Stunden im Brutschrank belassen: Komplette Hemmung. — Die Kontrolle, d. i. ungekupfertes Komplement 1 : 100 verdünnt, ergibt komplette Lysis.

Es ergibt sich somit aus den mitgeteilten Versuchen, daß in einem hämolytischen System, dessen Komplement der Kupferwirkung ausgesetzt war, die Lysis unterbleibt. Die komplettierende Eigenschaft des aktiven Serums geht also unter den angeführten Versuchsbedingungen verloren, wenn die oben supponierte Beziehung zwischen Serum

und Metall hergestellt wird. Dabei konnten wir eine obere Grenze der Komplementkonzentration feststellen, bis zu der die Zerstörung des Komplements praktisch vollständig ist (Versuch 3), während bei Anwendung höherer Konzentrationen die Lysis nur unvollständig gehemmt wird. Da in allen diesen Versuchen die Amboceptormenge stets die gleiche war, kommt als Angriffspunkt der Metallwirkung aller Wahrscheinlichkeit nach nur das Komplement in Frage. Immerhin bleibt zu erörtern, ob nicht auch die anderen Glieder des hämolytischen Systems eine Änderung durch das Metallwasser erfahren.

5. 0,05 ccm einer 20 proz. Aufschwemmung von Hammelerythrocyten werden mit 2 ccm Cu-Wasser geschüttelt, sodann eine halbe Stunde lang im Brutschrank stehengelassen, abzentrifugiert, gewaschen und endlich der hämolytische Versuch angestellt.

0,05 ccm gekupferte Erythrocyten + 1,0 ccm NaCl-Lösung + 0,01 ccm Komplement + 0,002 ccm Amboceptor: Lysis.

0,05 ccm normale Erythrocyten + 1,0 ccm NaCl-Lösung + 0,01 ccm Komplement + 0,002 ccm Amboceptor: Lysis.

Die Löslichkeit der Erythrocyten erfährt durch den Kontakt mit Cu-Wasser somit keine Änderung.

6a. Amboceptor wird im Verhältnis 1 : 500 mit Cu-Wasser durch 6 Stunden im Eisschrank stehengelassen. Um eine eventuelle Abgabe von überschüssigem Cu an zugesetztes Komplement zu vermeiden, wurde der gekupferte Amboceptor mit Erythrocytenaufschwemmung 1 : 0,05 eine halbe Stunde im Brutschrank stehengelassen, die Erythrocyten wurden sodann abzentrifugiert, gewaschen und mit Komplement versetzt: Komplette Lysis.

6b. Bis 1 : 1600 ausgewerteter Amboceptor wird mit Cu-Wasser 1 : 500, 1 : 1000, 1 : 1500 gemischt, sodann nach 6 Stunden Stehen im Eisschrank mit Blutkörperchenaufschwemmung 1 : 0,05 versetzt, nach $^1/_2$ Stunde Brutschrank abzentrifugiert. Die Erythrocyten wurden hierauf gewaschen und der Einwirkung von Komplement unterworfen. Als Kontrolle dient ebenso verdünnter, nichtgekupferter Amboceptor bei sonst gleicher Versuchsanordnung.

Gekupferter Amboceptor	Lysis	Ungekupferter Amboceptor	Lysis
1 : 500	komplett	1 : 500	komplett
1 : 1000	inkomplett	1 : 1000	„
1 : 1500		1 : 1500	„

Der Amboceptor hingegen erleidet bei hochgradiger Verdünnung bis nahe an die Titergrenze eine gewisse Abschwächung, die sich in unkom-

pletter Lysis manifestiert, doch erscheint es unmöglich, seine Wirkung vollständig aufzuheben wie es beim Komplement der Fall war.

Die komplettierende Eigenschaft des aktiven Serums zerfällt bekanntlich in 2 Komponenten: Die Bindungsfähigkeit an den Amboceptor (Mittelstück) und die lytische Wirksamkeit (Endstück). Daß das Metall nur die letztgenannte Komponente beeinflußt, ist nach folgendem Versuch wahrscheinlich:

7. Amboceptor wird 1 : 50 mit NaCl-Lösung verdünnt, zu gleichen Teilen mit nativem Meerschweinchenserum gemischt, $^1/_2$ Stunde im Brutschrank stehengelassen, das Gemisch hierauf 1 : 100 a) mit Cu-Wasser, b) mit gewöhnlicher NaCl-Lösung verdünnt, 6 Stunden stehengelassen, sodann zu je 1 ccm der angegebenen Verdünnung 0,05 Erythrocytenaufschwemmung zugesetzt und 2 Stunden im Brutschrank gelassen.

Ergebnis: a) 0,
b) komplette Lysis.

III.

Überblickt man die Versuche, die zum Zwecke der inneren Antisepsis von den verschiedensten Autoren angestellt worden sind, so erklären sich, wenn man von der Bekämpfung der Spirillosen durch P. Ehrlich und vielleicht noch der Chininwirkung bei Malaria und der Wirkung des Emetins auf die Amöben der Dysenterie absieht, die Mißerfolge dieser Bemühungen im wesentlichen aus 2 Momenten: Entweder ist es die hohe Organotropie des Desinfiziens, welche die Anwendung geeigneter Quantitäten desselben und damit die Erreichung einer zur Desinfektion nötigen Konzentration verbietet, oder es erleidet die bactericide Kraft des Arzneistoffes im kolloidalen Medium des Serums oder der Gewebsflüssigkeiten eine so weitgehende Abschwächung, daß der Erfolg vereitelt wird. Praktisch kommen zumeist beide Faktoren gleichzeitig in Betracht. Diese Erwägungen gelten nicht nur für die chemischen Desinfektionsmittel (Chemotherapie im engeren Sinne), sondern auch für die zum Teil physikalischen Kräfte, welche die photodynamischen Mittel entfalten, deren praktische Anwendung bisher keinen Erfolg brachte. Demgegenüber zeigen die Erfahrungen über die komplexen, im Serum immunisierter Tiere vorhandenen Lysine, daß Körper dieser Kategorie in ihrer Wirkung durch Serum nicht beeinträchtigt werden: Hier handelt es sich eben um so hohe Grade der Spezifität,

daß eine Ablenkung, sei es durch Serum, sei es durch die Körperzellen, nicht in Betracht kommt. Wollte man die bactericide Funktion oligodynamisch wirksamer Flüssigkeiten zur inneren Antisepsis heranziehen, so wäre zunächst die Frage der Organotropie zu erörtern. In Versuchen, welche früher mitgeteilt wurden[1], konnte gezeigt werden, daß Hämolyse durch solche Flüssigkeiten erzielt werden kann. Eine Alteration sowohl der Erythrocyten als auch anderer Körperzellen in vivo wäre daher immerhin im Bereiche der Möglichkeit gelegen. Freilich zeigten schon die Studien über Hämolyse, daß die Lysis durch oligodynamische Metallwirkung im kolloiden Medium des Serums in vitro eine beträchtliche Einschränkung erfährt. Um diesbezügliche Klarheit zu gewinnen, haben wir an Ratten durch Wochen hindurch Tag für Tag Injektionen mit oligodynamischen Cu-Lösungen vorgenommen; injiziert wurden, je nach Größe der Tiere 2—5 ccm täglich. Zur Kontrolle dienten Injektionen gleicher Quantitäten physiologischer NaCl-Lösung. Die histologische Untersuchung der Organe ergab in keinem Falle wesentliche Veränderungen. Ebenso blieb jede Hämolyse aus. Eine Zellschädigung durch oligodynamische Flüssigkeiten kommt somit nicht in Betracht, hingegen haben Salus[2], Baumgarten u. Luger[3], Saxl[4] u. a. darauf hingewiesen, daß in vitro die Gegenwart von Serum die bactericide Wirkung solcher Flüssigkeiten weitgehend abschwächt. Ebenso hat uns das Studium der Hämolyse, wie schon mehrmals bemerkt wurde, ergeben, daß zwar Suspensionen von Erythrocyten in NaCl-Lösung durch oligodynamische Flüssigkeiten hämolysiert werden, daß jedoch Serum statt NaCl-Lösung als Suspensionsmittel verwendet, die Hämolyse hemmt. Dieser hemmende Einfluß des Serums auf die bactericide und hämolysierende Fähigkeit oligodynamischer Lösungen läßt sich in Parallele stellen zu der erwähnten Abschwächung anderer Desinfizientien durch Serum. Dabei muß aber betont werden, daß diese Abschwächung bei oligodynamischen Flüssigkeiten im

[1]) L. Hess und R. Reitler, l. c.

[2]) G. Salus, oligodysamische Metallwirkungen. Wiener Klin. Wochenschrift 1919 Nr. 51.

[3]) A. Baumgarten und A. Luger, Über die Wirkung verdünnter Metallsalzlösungen auf Diastose. Ebenda, 1917 Nr. 39.

[4]) P. Saxl, Wiener Klin. Wochenschr. 1917 Nr. 23 u. 31; 1919 Nr. 40, Mediz. Klinik 1917 Nr. 28 u. 46 (daselbst ausgiebige Literaturnachweise).

Gegensatze zu der anderer Antiseptica so hochgradig ist, daß sie zur fast völligen Aufhebung der Bactericidie führt.

Wenn somit oligodynamische Lösungen im Tierexperiment keine Organotropie zeigen, anderseits ihre Bactericidie fast völlig einbüßen, kommt für die Zwecke der inneren Desinfektion nur der eine Weg in Betracht, die wirksamen Metallteilchen durch Fixierung an Zwischenkörper, deren Ablenkbarkeit durch Serum infolge ihrer Spezifität gleich Null ist, an die Bakterien heranzubringen. Es würde in diesem Versuchsplan nach den Vorstellungen, welche Ehrlich entwickelt hat, der Zwischenkörper die Schiene sein, welche das Metall in oligodynamischer Verdünnung an den Erreger heranträgt. Naturgemäß muß die Bindung zwischen Metall und Zwischenkörper vor Einwirkung auf etwaige im Serum suspendierte Erreger erfolgen. Für die Rolle eines derartigen Zwischenkörpers käme in erster Linie ein spezifischer Amboceptor in Betracht.

Unsere Versuche über die Beeinflussung des komplexen hämolytischen Systems haben jedoch gelehrt, daß eine Bindung des Cu an den Amboceptor nicht stattfinden dürfte (vgl. Versuch 6a). Mit Sicherheit beweist dieser Versuch das Fehlen einer derartigen Bindung nicht, da diese bestehen könnte, auch ohne sich in Hemmung der Hämolyse zu äußern. Immerhin schien es ratsamer, jenen Körper zur Fixation des Metalls zu verwenden, dessen Bindungsfähigkeit an dasselbe feststeht: das Komplement. Zwecks Bindung des mit Metall beladenen Komplementes an die Bakterienzellen mußte der entsprechende Amboceptor zwischengeschaltet werden[1]). Es war also eine Kette: Antigen-Amboceptor-Komplement-Metall herzustellen, wobei dem Immunkörpersystem die Funktion der Schiene im Sinne Ehrlichs zufiel. Unsere Versuche sollten erweisen, ob sich eine keimtötende Wirkung oligodynamischer Lösungen trotz der zwischengeschalteten Eiweißkörper geltend macht.

Versuch: Polyvalentes Streptokokkenserum (Paltauf) wird mit frischem Meerschweinchenserum (d. i. Komplement) zu gleichen Teilen gemischt und

[1]) Mit Rücksicht auf die oben beschriebene hemmende Wirkung des Metallwassers auf die lytische Funktion des Komplements kommt eine Addition des oligodynamischen und spezifisch bakteriolytischen Effektes kaum in Betracht.

a) mit 12tägigem „Kupferwasser",
b) mit physiologischer Kochsalzlösung,

beide Male im Verhältnis 1 : 50 verdünnt, ferner werden

c) polyvalentes Streptokokkenserum allein (d. i. Amboceptor),
d) Meerschweinchenserum (d. i. Komplement) allein,

beide Male im Verhältnis 1 : 100 mit „Kupferwasser" verdünnt. Als Kontrolle dient

e) 12tägiges Kupferwasser,
f) physiologische Kochsalzlösung,

beide ohne weiteren Zusatz.

Zu je 1 ccm dieser Lösungen werden 0,1 ccm einer Streptokokkenaufschwemmung in Kochsalzlösung hinzugefügt und

I. 24 Stunden im Brutschrank,
II. 24 „ „ Eisschrank

stehengelassen. Hierauf wird je 1 Öse auf einer Agarplatte ausgestrichen und nach 24 Stunden Brutschrank die Kolonienzahl festgestellt.

I.	a)	0
	b)	0
	c)	0
	d)	0
	e)	0
	f)	+++

Sowohl das im Überschusse vorhandene oligodynamisch wirksame Kupferwasser (a, c, d, e) als auch das bakteriolytische System (b) haben in dieser Versuchsanordnung das Bakterienwachstum komplett gehemmt.

II.	a)	213	Kolonien
	b)	643	„
	c)	60	„
	d)	711	„
	e)	25	„
	f)	1020	„

Die intensivste Wachstumshemmung ergibt somit Kupferwasser allein (e). Von diesem bereits bekannten oligodynamischen Effekt soll weiter hier nicht mehr die Rede sein. Die Mischung von Kupferwasser mit amboceptorhaltigem Serum (c) zeigt nur eine geringe Verminderung der bactericiden Kupferwirkung. Diese Verminderung wird hinreichend erklärt durch die jedem Serum zukommende Fähigkeit, die Wirkung aller Desinfizientien, insbesondere die oligodynamische Wirkung abzuschwächen. Demgegenüber fällt auf, daß komplementhaltiges Meerschweinchenserum in gleicher Verdünnung die Kupferwirkung in ganz erheblichem Maße ein-

schränkt) d). Diese große Differenz kann wohl kaum auf die verschiedene Herkunft der beiden Sera allein zurückgeführt werden. Sie gemahnt uns an die in den früheren Abschnitten besprochene differente Fällbarkeit aktiver und inaktiver Sera, sowie an die Aufhebung der Komplementwirkung durch Kupferwasser. Vielleicht könnte man an eine Ablenkung der Kupferwirkung durch das Komplement denken. Wir kommen auf die Frage noch einmal zurück. Bei Gegenwart von Kupferwasserkomplement und Amboceptor, d. h. wenn eine Bindung des „gekupferten" Komplements an die Keime anzunehmen ist, tritt die Kupferwirkung wieder deutlicher hervor (a) und übertrifft sogar die keimtötende Kraft des bakteriolytischen Systems allein (b). Dieser Effekt (a) kann nicht der Ausdruck einer additiven Wirkung zweier Desinfizientien, nämlich der keimtötenden Kraft des Cu-Wassers vermehrt um die bakteriolytische Kraft des Immunserums sein. Die Versuche, über welche im Abschnitt II berichtet wurde, haben ja gezeigt, daß bei einer Mischung von Kupferwasser mit Komplement und Amboceptor eine Zerstörung der Immunkörperwirkung eintritt. Damit werden wir zu der Annahme gedrängt, daß bei der Kombination: Kupfer-Komplement-Amboceptor keine Immunkörper-, sondern bloß eine Kupferwirkung zur Geltung kommt. Doch wäre zu erwarten, daß die Kupferwirkung bei diesem Versuch gegenüber Versuch e) (Kupferwasser allein) im gleichen Maße vermindert würde wie im Versuch d) (Kupfer-Komplementmischung), da in beiden Versuchen die gleiche Menge Komplement und Kupfer verwendet wurde und somit die gleiche Menge überschüssigen, nicht an das Komplement gebundenen Kupfers zur Wirkung kommen mußte. Die stärkere Keimtötung im Versuch a) gegenüber Versuch d) bedarf somit einer Erklärung. Die Versuchsanordnungen d) und a) unterscheiden sich voneinander bloß durch die Gegenwart des Amboceptors im letzteren Falle. Somit kann nur dieses Moment die Erhöhung der bactericiden Wirkung erklären. Wir stellen uns daher vor, daß nicht bloß das überschüssige Cu zur Wirkung gelangt, sondern auch das an das Komplement gebundene mit Hilfe des Amboceptors zum Teil wenigstens auf die Keime übertragen wurde.

Ungeklärt bleibt einstweilen, wie schon angedeutet wurde, die Tatsache der Hemmung der bactericiden Cu-Wirkung durch Komplement. Überdies spielen aber in der soeben mitgeteilten Versuchsanordnung der oligodynamische Effekt des überschüssigen Kupfers und die hypothetische Wirkung des mit Hilfe des Immunitätskörpersystems auf die Bakterien übertragenen Cu in so verwickelter Weise ineinander, daß eine klarere und übersichtlichere Anordnung der Versuchsbedingungen geboten erscheint.

Komplement- und Kupferwirkung.

Frisches Meerschweinchenserum wird zur Hälfte aktiv, zur Hälfte inaktiv im Verhältnis 1 : 100 mit 8tägigem Kupferwasser verdünnt, mit Streptococcus brevis gleichmäßig beimpft und durch 24 Stunden im Eisschrank stehengelassen. Sodann wird von jedem Röhrchen je 1 Öse auf 4 Agarplatten ausgestrichen und diese durch 24 Stunden im Brutschrank belassen. Die durchschnittliche Kolonienzahl betrug:

Inaktives Serum	48	Kolonien
aktives „	68	„
Kontrolle in phys. NaCl-Lösung	116	„

Kupferwasser hat somit in Gegenwart von aktivem wie inaktivem Serum das Bakterienwachstum eingeschränkt. Da aber die Kolonienzahl bei Gegenwart von aktivem Serum um $^1/_6$ größer war als bei Gegenwart von inaktivem Serum, hat das aktive Serum die bactericide Wirkung des Kupferwassers mehr eingeschränkt.

Der zweiten der oben aufgestellten Forderungen glauben wir in folgender Weise Genüge geleistet zu haben: Um vorerst eine Bindung zwischen Immunkörpersystem und Kupfer herzustellen, wurde eine Mischung von polyvalentem Streptokokkenserum und frischem Meerschweinchenserum (2 : 1) mit 8tägigem Kupferwasser im Verhältnis 1 : 20 verdünnt. Um die oligodynamische Wirkung des überschüssigen Kupfers, d. h. des nicht an Komplement gebundenen, auszuschalten, wurde die 10fache Menge inaktiven normalen Kupferserums zugesetzt. Wir nähern uns durch diesen Vorgang den in vivo gegebenen Verhältnissen. Als Kontrolle dienten reines Kupferwasser + inaktives Pferdeserum (1 : 10), sowie das erwähnte Komplement-Amboceptorgemisch mit gewöhnlicher Kochsalzlösung 1 : 20 verdünnt und ebenfalls mit der

10fachen Menge des Pferdeserums versetzt. Alle Röhrchen mit Streptococcus brevis beimpft, verblieben bei 37° im Brutschrank. Nach 6 und 12 Stunden wurden auf Agarplatten in der üblichen Weise Kulturen angelegt und die Kolonien ausgezählt. Wir teilen als Beispiel mit:

A. Nach 6 Stunden:

Cu-Wasser	96 Kolonien
Immunkörpersystem . .	(verunreinigt)
Cu-Immunkörpersystem	132 Kolonien

B. Nach 12 Stunden:

Cu-Wasser	269 „
Immunkörpersystem .	535 „
Cu-Immunkörpersystem	32 „

Längere Verweildauer der Röhrchen im Brutschrank verwischt wieder die nach 12 Stunden hervorgetretenen Differenzen. Wir sehen von der detaillierten Wiedergabe der bezüglichen Protokolle ab.

Weitere analoge Versuche mit verschieden dichter Beimpfung der Röhrchen zeigten naturgemäß Differenzen im prozentuellen Verhältnis der Kolonienzahl von Kupferwasser zum Immunkörpersystem und gekupfertem Immunkörpersystem. Ein Optimum gaben die Versuche mit mitteldichter Beimpfung und bei der Verweildauer von 12 Stunden. Im Prinzip fielen aber alle Versuche gleichsinnig aus, wie die Durchschnittszahlen aus sämtlichen Versuchen nach 12 Stunden zeigen:

Kupferwasser	977 Kolonien
Immunkörpersystem. . .	1126 „
Cu-Immunkörpersystem .	362 „

Es scheint uns somit erwiesen, daß die *oligodynamische Cu-Wirkung im Serum nach vorhergehender Bindung an ein spezifisches Immunkörpersystem merklich besser zur Geltung kommt als ohne dieses.* Die Zahl der entwicklungsfähigen Keime wurde stets, mitunter sogar außerordentlich stark verringert, doch konnte eine völlige Desinfektion bisher nicht erreicht werden. Der Grund hierfür dürfte ein doppelter sein: Fürs erste wird sicherlich nicht das gesamte Cu an das Komplement gebunden, sondern ein Teil von den übrigen kolloiden Substanzen des komplementhaltigen Serums abgelenkt. Zweitens aber ist eine gewisse Abschwächung der

bactericiden Kraft des Metalls durch die Zwischenschaltung des Immunkörpersystems mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen.

Die entwicklungshemmende Wirkung der an ein Immunkörpersystem gebundenen Cu-Teilchen auf Bakterien unter Bedingungen, welche den in vivo gegebenen ziemlich nahe kommen, stellt ein Paradigma dar, nach welchem im Prinzip auch andere Desinfizientien im Serum in hoher Verdünnung zur Wirkung gebracht werden könnten.

Weitere Versuche haben demnach zu lehren:

1. Ob das von uns eingeführte Prinzip bloß für oligodynamische Lösungen oder aber auch für chemisch anders geartete Desinfektionsmittel Geltung besitzt und

2. Ob die in vitro angestellten Beobachtungen sich auch in vivo erheben lassen. Wir behalten uns vor, über die Ergebnisse dieser Untersuchungen zu berichten.

Brenztraubensäure als Zwischenprodukt der alkoholischen Zuckerspaltung.

Von

Max v. Grab, Prag.

(Eingegangen am 21. Juni 1921.)

Ganz zu Beginn des Jahres 1911 haben C. Neuberg und H. Wastenson mitgeteilt und demonstriert [1]), daß die Brenztraubensäure von Hefe vergoren wird. Kurze Zeit darauf haben den Gedanken, daß eine solche Umsetzung möglich sein könne, auch O. Neubauer und K. Fromherz [2]) im Verlauf ihrer Studien über den physiologischen Abbau der Aminosäuren, namentlich betreffs der Umwandlungen von Alanin, geäußert, nachdem O. E. Ashdown und J. Th. Hewitt [3]) bereits eine Beziehung dieser Aminopropionsäure zur alkoholischen Gärung angenommen hatten. Während nun in dem verflossenen Jahrzehnt keiner der letztgenannten Autoren auf den betreffenden Gegenstand zurückgekommen ist, hat Neuberg in ausführlichen Untersuchungen der Brenztraubensäure-vergärung seine Beobachtung verfolgt und die dadurch aufgeworfenen Fragen aufgeklärt [4]).

Es ergab sich, daß diese α-Ketonsäure zu Acetaldehyd und Kohlendioxyd vergoren wird, und es zeigte sich weiterhin, daß für diese Reaktion ein besonderes Ferment verantwortlich gemacht werden muß, das wegen seiner sinnfälligsten Wirkung, der Kraft zur glatten Abspaltung von Kohlensäure, den Namen Carboxylase erhalten hat. Sodann wurde festgestellt, daß die Temperaturgrenzen — soweit frische Hefen in Betracht gezogen werden — für den gewöhnlichen alkoholischen Zuckerzerfall und für die Brenztraubensäuregärung gleich sind und daß die Mengenverhältnisse, in denen die Hefen wirken, beidemal einander entsprechen.

---

[1]) C. Neuberg und H. Wastenson, Sitzungsber. d. Berl. physiol. Ges. vom 20. I. 1911.

[2]) O. Neubauer und K. Fromherz, H. **70**, 349. 1911 (erschienen am 30. I. 1911).

[3]) O. E. Ashdown und J. Th. Hewitt, Journ. of the chem. soc. **97**, 1636. 1910.

[4]) C. Neuberg und Mitarbeiter, diese Zeitschr. 1911—1920.

Die Vergärbarkeit der Brenztraubensäure ist ein lehrreiches Beispiel für die Bedenklichkeit von Voraussagen; hat doch Ad. Mayer[1]) in seinem bekannten Lehrbuche der Gärungschemie gerade die Brenztraubensäure unter den Substanzen angeführt, die niemals gärfähig sein sollten!

Auf Grund weiterer Befunde auf diesem Gebiete, insbesondere der Erkenntnis, daß wie die Zymasegärung des Zuckers sich ebenso die carboxylatische Zerlegung der Brenztraubensäure von der lebenden Zelle abtrennen läßt, mit anderen Worten, daß sowohl Trockenhefen wie Aceton- und Alkohol-Ätherpräparate als auch Macerations- und Preßsäfte Carboxylase enthalten, sowie aus anderen Gesichtspunkten heraus erwuchs die Vorstellung, daß die Brenztraubensäure ein Zwischenprodukt bei der alkoholischen Gärung ist und daß die Carboxylase ein Teilferment des Zymasekomplexes darstellt. Gefördert wurde diese Anschauung durch das Ergebnis, daß bei der Brenztraubensäuregärung unter Umständen nicht nur Acetaldehyd, sondern auch Alkohol auftritt. An Tatsächlichem ist sicher, daß — ganz abgesehen vom Kohlendioxyd — der Acetaldehyd dem typischen Produkte der normalen Gärung, dem Äthylalkohol, ganz wesentlich näher steht als irgendeine Substanz, die bisher bei Spekulationen über die Gärungsfrage als Zwischenglied in Betracht gezogen war. Denn vergegenwärtigt man sich, daß der Oxydationshub, der wahrscheinlich am Gliede des Methylglyoxals ansetzt und diesen Ketonaldehyd auf die Brenztraubensäurestufe hinaufführt, anaerob, ohne Beteiligung atmosphärischen Sauerstoffs, geleistet wird, so muß auf der Kaskade der Zuckerzerfallsprodukte irgendwo und in irgendeiner Form ein Äquivalent „Wasserstoff" disponibel werden, der schließlich durch eine gekoppelte Reaktion den bei der carboxylatischen Spaltung der Brenztraubensäure erzeugten Acetaldehyd in Weingeist zu verwandeln vermag. Da diese Reaktion eines jeden Moleküls Brenztraubensäure die Bereitstellung eines Moleküls „Gärungswasserstoff" in sich schließt, so sieht man, daß die intermolekular zu denkenden Oxydations- und Reduktionsvorgänge einander genau die Wage halten und daß jene glatte Korrelation bestehen kann, die in der üblichen Gärungsgleichung: $C_6H_{12}O_6 = 2\,CO_2 + 2\,C_2H_5 \cdot OH$ den Wechsel von Oxydation und Reduktion gar nicht zum Ausdruck kommen läßt. Den Grund, warum die Natur diesen scheinbaren Umweg einschlägt, darf man wohl darin suchen, daß letzten Endes die Kohlendioxydloslösung nur aus einer Carbonsäure erfolgen kann, nicht dagegen aus Gebilden, die wie die Sechs-Kohlenstoffzucker (oder allenfalls die Triosen bzw. das wasserärmere Methylglyoxal) keinen Kohlensäurerest in sich bergen. Alle Substanzen, an die man früher als Durchgangsprodukte gedacht hatte, kommen hierbei nicht in Betracht, auch nicht die Milchsäure, deren Carboxyl bekanntlich sehr fest im Molekül haftet und die keinerlei Neigung zu unmittelbarem Zerfall in Kohlendioxyd und Äthylalkohol bekundet; J. U. Nef[2]) hat den Nachweis geliefert, daß

[1]) Ad. Mayer, Gärungschemie, IV. Auflage, S. 209. 1895.

[2]) J. U. Nef, Ann. **335**, 279 u. 298. 1904; vgl. auch A. Slator, Chem. Centralblatt **1906**. I. 383 u. 1034.

Milchsäure unter keinen Umständen als direktes Gärungszwischenprodukt gelten darf; dagegen hat auch dieser Autor auf Grund seiner bekannten Untersuchungen über die Dissoziationsvorgänge in der Zuckerreihe dem Methylglyoxal in Übereinstimmung mit den etwas anders formulierten Hinweisen von Windaus und Knoop[1]), Erlenmeyer[2]) und namentlich von Wohl[3]) eine bedeutende Rolle für den Zuckerabbau zugeschrieben.

Das gesamte Tatsachenmaterial hat dann Neuberg im Jahre 1913 zur Aufstellung seiner neuen Gärungstheorie gedient; sie enthält als Voraussetzung im wesentlichen die intermediäre Entstehung von Methylglyoxal, die durch chemische Erfahrungen wahrscheinlich gemacht ist. Dieser Stoff vermag nun durch eine Reihe von Dismutationen (Cannizzaroschen Reaktionen) in alle die Zwischenglieder überzugehen, die für den Ablauf des Gärungsvorganges zu fordern sind. Zunächst könnte eine Disproportionierung das als ständiges Nebenprodukt beobachtete Glycerin einerseits und die Brenztraubensäure andererseits hervorbringen. Von letzterer führen bekannte Wege zum Acetaldehyd und zum Weingeist, und man braucht sich nur vorzustellen, daß durch Eintritt der ersten Dismutation aus einer der mannigfachen Methylglyoxalformen auch nur 1 Molekül Brenztraubensäure hervorgeht, um sodann das große Schwungrad der Dekomposition im Gang zu halten. Nunmehr bedarf es nämlich nur einer gemischten Dismutation zwischen den beiden Aldehyden Methylglyoxal und Acetaldehyd, die stets zu weiter vergärbarer Brenztraubensäure und dem nicht mehr veränderlichen Endprodukte Äthylalkohol führt. Eine experimentelle Begründung erfuhr dieser Teil der Neubergschen Gärungstheorie durch den von Nord erbrachten Nachweis[4]), daß in der Tat eine gemischte Dismutation zwischen ungleichen Aldehyden der aliphatischen Reihe möglich ist. Als willkürliche Annahme bleibt demnach das Auftreten von Brenztraubensäure und Methylglyoxal bestehen. Daß man letzteres selbst bisher nicht mit Sicherheit[5]) hat vergären können, mag daran liegen, daß von den zahlreich möglichen Isomeren dieser vielgestaltigen Verbindung, unter denen sich auch optisch-aktive Konstruktionen befinden, in vitro nur ein einziges Gebilde darstellbar ist, dessen feineren Bau wir nicht kennen, das wir aber wohl als die beständigste, somit für die biologische Weiterverarbeitung am wenigsten geeignete Form betrachten dürfen. Da das Methylglyoxal in letzter Linie nichts anderes darstellt als ein Anhydrid der Hexosen, so wird man sich mit der Hypothese abfinden können, daß der Weg des Abbaues über eine zerfallsbereite Modifikation dieses Brenz-

---

1) A. Windaus und F. Knoop, B. **38**, 1166. 1905.

2) E. Erlenmeyer jun., Chem. Centralblatt **1905**. I. 1533.

3) A. Wohl, diese Zeitschr. **5**, 45. 1907.

4) F. F. Nord, diese Zeitschr. **106**, 275. 1920.

5) Früher hat A. v. Lebedew angegeben (diese Zeitschr. **46**, 489. 1912), daß Methylglyoxal unter bestimmten Bedingungen alkoholische Zuckerspaltung erleide; später hat er diese Behauptung (B. **47**, 967. 1914) zurückgezogen, neuerdings (Ch. C. **1918**, II. 52) will er sie wieder gelten lassen.

traubensäurealdehyds führt. Obgleich betreffs der Vergärbarkeit der zugehörigen Säure, der Brenztraubensäure, kein Zweifel besteht, erschien es als eine lohnende Aufgabe, die intermediäre Bildung dieser Substanz bei der alkoholischen Zuckerspaltung durch Versuche zu beweisen.

Die seit Neubergs Entdeckung der Pyruvinatgärung für die physiologische Rolle der Brenztraubensäure angeführten Gründe sind allerdings bereits von erheblichem Gewichte gewesen.

Der Umstand, daß außer den Hefen eine ganze Anzahl anderer Mikroorganismen sowie höherer Pflanzen, welche Kohlenhydrate veratmen, Carboxylase enthalten, sprach sehr für die Bedeutung ihres spezifischen Substrates, eben der Brenztraubensäure. In dieser Richtung verweise ich auf die Mitteilungen von Zaleski und Marx[1]), Palladin, Gromoff und Monteverde[2]), Bau[3]), Bodnar[4]), Boas[5]), Peterson und Fred[6]) sowie Nagayama[7]). H. von Euler und E. Löwenhamm[8]) fanden, daß Brenztraubensäure ein ebenso gutes Bildungsmaterial für das Enzym Invertase abgibt wie Zucker, und M. Jacoby[9]) hat das gleiche bezüglich der Urease gezeigt; ferner hat F. Ehrlich[10]) mitgeteilt, daß die genannte α-Ketonsäure den verschiedenen Kultur- und Kahmhefen als ein leicht ausnutzbarer Kraft- und Kohlenstoffspender dienen kann. Von G. Wagner[11]) rührt die wichtige Feststellung her, daß Brenztraubensäure auch in den üblichen Nährböden zur Heranzüchtung zuckerzehrender Organismen das Kohlenhydrat glatt zu vertreten vermag. Für den tierischen Organismus liegt gleichfalls eine Reihe von Beobachtungen (P. Mayer, Tschernorutzki, Róna, Neukirch und Wacker) vor, die darauf hindeuten, daß Brenztraubensäure als Glykogenbildner sich betätigen und besser als viele in dieser Richtung geprüfte Substanzen die Zucker der 6-Kohlenstoffreihe (vgl. Isaac und Adler) als Quelle energetischer Leistungen ersetzen und zugleich synthetischen Zwecken (Emden und Schmitz, Fellner, Knop und Kertess) dienen kann.

---

[1]) W. Zaleski und E. Marx, diese Zeitschr. **48**, 175. 1913; Chem. Centralblatt **1914**. I. 1961 u. 1962.

[2]) W. Palladin, N. Gromoff und N. N. Monteverde, diese Zeitschr. **62**, 137. 1914.

[3]) A. Bau, diese Zeitschr. **73**, 340. 1916.

[4]) J. Bodnar, diese Zeitschr. **73**, 193. 1916.

[5]) Fr. Boas, Chem. Centralblatt **1916**. I. 431.

[6]) W. H. Peterson und E. B. Fred, Journ. of biol. chem. **44**, **41**. 1920.

[7]) T. Nagayama, diese Zeitschr. **116**, 303. 1920.

[8]) H. v. Euler und E. Löwenhamm, H. **97**, 290. 1913.

[9]) M. Jacoby, diese Zeitschr. **79**, 41. 1917.

[10]) F. Ehrlich, diese Zeitschr. **36**, 496. 1911.

[11]) G. Wagner, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I. **71**, 33. 1913; Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **90**, 58. 1920.

Somit war es gerechtfertigt, daß Neuberg[1]) und in neuerer Zeit auch Abderhalden[2]) die Brenztraubensäure in den Mittelpunkt physiologischer Reaktionsfolgen gerückt haben. Immerhin sind die angeführten Argumente nur indirekter Natur, und der positive Nachweis des Auftretens von Brenztraubensäure beim Vorgange der alkoholischen Gärung hat bisher gefehlt. Es erschien daher als ein großer Fortschritt, als Fernbach und Schoen[3]) behaupteten, das Vorkommen der Brenztraubensäure unter den Produkten der Zuckerspaltung gefunden zu haben. Leider betreffen, wie aus dem folgenden hervorgeht, ihre Angaben nicht die typische Hefengärung.

Die erwähnten Autoren teilten mit, daß ein einfacher Zusatz von kohlensaurem Kalk genüge, um bei der Hefengärung die intermediäre Bildung der Brenztraubensäure manifest werden zu lassen und die genannte α-Ketonsäure in nicht unbeträchtlichen Mengen anzuhäufen. Sie soll nämlich (neben anderen atypischen Produkten sauren Charakters) in Form ihres Kalksalzes in einer Ausbeute von 8,04% bei der Vergärung des Zuckers in Gegenwart von Kreide entstehen. Joh. Kerb[4]) hat die Angaben der genannten Forscher jedoch nicht bestätigen können. Während die Fixation nennenswerter Mengen von Pyruvinat (und anderen Salzen) den Ertrag an Sprit ersichtlich hätte herabdrücken müssen, fand Kerb vielmehr praktisch die normalen Alkoholausbeuten bei der Vergärung in Gegenwart von Calciumcarbonat und nur eine geringfügige Vermehrung des Gehaltes an Acetaldehyd sowie Essigsäure, deren Quantität erfahrungsgemäß stets etwas gesteigert ist, sobald man die Hefe durch Verminderung der natürlichen Acidität zwingt, sich selbst durch Zersetzung von Zucker eine für ihr Fortkommen geeignete H-Ionen-Konzentration in der Maische zu schaffen. Aber auch wenn man für einen Augenblick die uneingeschränkte Richtigkeit der Angaben von Fernbach und Schoen annehmen wollte, so gelangt man doch zu dem Schluß, daß diese nicht auf die Vorgänge der eigentlichen alkoholischen Zuckerspaltung bezogen werden dürfen. Während nämlich die Autoren anfangs die Brenztraubensäurebildung auch für die Umsetzung von Zucker durch beliebige Hefen behauptet hatten, sprechen sie später nur von einer diesbezüglichen Tätigkeit zweier Spezialrassen, der „Mykolevure“ und der „Champagne-Hefe“; letztere soll überdies nach ihrer jüngsten Angabe wesentlich schwächer wirken. Nach Auskunft des Handbuchs von Lafar stellt der erste Erreger eine wilde, auf Opuntien wachsende Hefe dar,

[1]) C. Neuberg, l. c.

[2]) E. Abderhalden, Lehrbuch der physiol. Chemie 1920/21, Bd. I, S. 139, 229, 437, 629; Bd. II, S. 261, 385.

[3]) A. Fernbach und M. Schoen, Cpt. rend. **157**, 1478. 1913; **158**, 1719. 1914; **170**, 764. 1920.

[4]) J. Kerb, B. **52**, 1795. 1919; vgl. A. v. Lebedew, Biochem. Journ. **11**, 189. 1919.

während der zweite Pilz wohl zu den Weinhefen, also gleichfalls zu den wilden Hefen, gehört. Ohne daß ich Genaueres über die Stellung dieser beiden besonderen Erreger angeben kann, scheint es sicher, daß sie in ihrem Verhalten von dem der Kulturhefen, der Erzeuger der richtigen alkoholischen Gärung, wesentlich abweichen und (nach Duclaux) eher den oxydierenden Organismen verwandt sein dürften, zumal die Autoren eine Luftzufuhr nicht ausgeschlossen haben. Daß eine derartige Annahme wohl das richtige trifft, geht zunächst aus den Untersuchungen von Beijerinck und Folpmers[1]) sowie aus denen von Mazé und Ruot[2]) hervor. Die genannten Forscher haben nämlich dargetan, daß eine größere Anzahl von Mikroorganismen imstande ist, verschiedene Substrate unter Mitwirkung des atmosphärischen Sauerstoffs zu Brenztraubensäure zu verbrennen. Mazé und Ruot haben auch insbesondere eine solche Umwandlung des Calciumlactats festgestellt; sie betonen, daß dieselbe aber nur bei Nahrungsmangel sowie unter Aeration erfolgt, und sie bezeichnen diese Art von Brenztraubensäurebildung als Äußerung einer ungemein erschwerten Lebensführung, als „conditions de vie tres pénibles". Neuerdings ziehen denn auch Fernbach und Schoen eine oxydative Bildung der mit ihren Erregern erzielten Brenztraubensäureentstehung aus Milchsäure in Betracht und betonen, daß sie völlig ausbleibe, wenn ihre Pilze ausreichend ernährt werden. Lediglich auf einer mineralischen Lösung, die sogar an anorganischen Stickstoffverbindungen ziemlich arm ist, fanden sie Pyruvinat, und sie heben zugleich hervor, daß schon die übliche Anwendung von Bierwürze oder von ähnlichen, gewöhnliche organische Stickstoffquellen enthaltenden Substraten genügt, um das Auftreten jeglicher Menge von Brenztraubensäure zu vereiteln; das befindet sich allerdings mit ihrer früheren Angabe nicht ganz im Einklange, daß sie auch Pepton zur Kulturflüssigkeit gefügt hätten. Weiter ergibt sich aus ihrer Beschreibung, daß die anfangs gebildete Alkoholmenge bald (nach 10 Tagen) wieder abnimmt und in 24 Tagen auf 0 sinkt. Das ist in gleicher Weise bei Ansätzen mit und ohne Kreide der Fall; selbst in ihren Gärgemischen ohne $CaCO_3$ erreichte der Alkoholertrag niemals auch nur angenähert den theoretischen Wert (= ca. 50% des verbrauchten Zuckers). Ein solches Verhalten kommt nun keineswegs den echten Kulturhefen zu, sondern ist dem Kahm oder verwandten Mikroorganismen eigen; jedenfalls bezeugt es die Einmischung oxydativer Vorgänge. Die Autoren selbst nehmen nunmehr eine nicht unwesentliche Einschränkung auch durch die Angabe vor, daß nicht allein Zuckerarten, sondern andere Verbindungen — also wohl von Hefe nicht vergärbare Substanzen — ebenfalls Quellen ihres Pyruvinats sein können.

Als weitere Bedingung für die Entstehung von Brenztraubensäure wird eine minimale Aussaat bezeichnet. Nun ist seit den grundlegenden

---

[1]) M. W. Beijerinck und T. Folpmers, Koningl. Akad. van Wetenschap. Amst. **18**, 1198. 1916.

[2]) P. Mazé und M. Ruot, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **78**, 706. 1916; **79**, 336. 1917.

Untersuchungen **Pasteurs** sowie seit den Forschungen **Adolf Mayers** u. a. bekannt, daß die Kulturhefen in einer Nährflüssigkeit ohne organische Stickstofformen zwar eine vita minima fristen, aber nicht gärfähig sind. **N. Pringsheim**[1]) hat gezeigt, daß ein Gehalt an freien oder gebundenen Aminosäuren bzw. von Stoffen mit der Atomgruppierung $-\mathrm{CO}-\underset{|}{\mathrm{CH}}-\mathrm{NH}-$ in den Nährsubstraten für die Entwicklung der eigentlichen zymatischen Leistungen der Hefezellen erforderlich ist, während der Aufbau gärfähigen Plasmas aus Ammonsalzen nur schwierig und erst nach erfolgter Anpassung vonstatten gehen kann. Zudem ist es auch eine alte Erfahrung der Praxis, daß gärfähige Hefen nicht bei Ausschluß organischer Stickstoffnahrung herangezüchtet werden können; nur ein bestimmter Teil der letzteren darf durch mineralische Stickstoffsubstanzen substituiert sein[2]). Übrigens hat ganz kürzlich in **Henriques** Institut zu Kopenhagen **R. Ege**[3]) dargetan, daß selbst bei Anwesenheit von anorganischem und organischem Nahrungsmaterial sogar kleine Zuckermengen durch wenig Hefe nicht vergoren werden können (Vitaminmangel?). Somit geht aus den eigenen Angaben der französischen Autoren hervor, daß sie, ganz abgesehen von der fraglichen Zugehörigkeit ihrer Erreger zur Klasse der Kulturhefen, gar nicht unter Bedingungen gearbeitet haben, unter denen überhaupt eine echte alkoholische Zuckerspaltung eintreten kann, und daß ihre Befunde gleich den früher erwähnten von **Beijerinck**, **Folpmers** sowie denen von **Mazé** und **Ruot** zu werten sind als der Ausdruck irgendwelcher oxydativer Leistungen. Gerade diese aber spielen bekanntlich bei der wahren geistigen Gärung keine Rolle. Die alkoholische Zuckerspaltung mittels Hefe ist nicht nur ein in sich äquilibrierter Prozeß, der ohne äußere Aufnahme von Sauerstoff verläuft und bekanntlich zu einem unvollkommen oxydierten Endprodukte, dem Sprit, führt, sondern es steht fest, daß selbst Lüftung die alkoholische Gärung als solche nicht beeinträchtigt, vielmehr nur mittelbar beeinflußt, indem sie ein größeres Hefenwachstum und damit einen Verbrauch gärfähigen Zuckers für den Aufbau der Hefenleibessubstanz nach sich ziehen kann[4]). Dagegen ist nach **S. Kostytschew**[5]) bei Mucoraceen, wie Mucor stolonifer, der bei Luftabschluß schnell zugrunde geht, der Eintritt einer der alkoholischen Gärung ähnlichen Umsetzung unter Beteiligung des Sauerstoffs eine gelegentliche, in ihrem Ausmaße wechselnde Erscheinung; die gewisse Analogie mit der **Fernbach-Schoen**schen Beobachtung wird dadurch verstärkt, daß die letztgenannten angeben, daß gerade eine Mucorart, der Amylomyces Rouxii, weit besser als ihre „Hefen" in ihrem Sinne tätig sein könne.

Zu einem beweiskräftigen Ergebnis konnte man bei dieser

---

1) **N. Pringsheim**, B. **39**, 4048. 1906; diese Zeitschr. **3**, 121. 1907.

2) Vgl. **A. Wohl** und **S. Scherdel**, Chem. Centralblatt **1919**. II. 358.

3) **R. Ege**, diese Zeitschr. **107**, 236. 1920; vgl. auch **A. Costantino**, 1920.

4) Vgl. **F. Czapek**, Biochemie der Pflanzen, Bd. I, S. 337. 1913.

5) **S. Kostytschew**, H. **111**, 155. 1920.

Sachlage also nur durch eine Versuchsanordnung gelangen, die unter Verwendung der typischen Erreger der alkoholischen Gärung und bei Bedingungen, unter denen sich nachweislich die zymatische Zuckerspaltung vollzieht, d. h. namentlich unter anaeroben Verhältnissen, eine Isolierung von Brenztraubensäure ermöglicht.

Die bisherigen Methoden zum Eingriff in die alkoholische Zuckerspaltung haben nicht zu einer Fixierung der Brenztraubensäure geführt, weder das erste von Neuberg, Färber und Reinfurth[1]) ausgearbeitete Abfangverfahren, das in der Anwendung sekundärer schwefligsaurer Salze besteht, noch die spätere Dimedonmethode von Neuberg und Reinfurth[2]), noch auch die Einleitung der sogenannten dritten Vergärungsform, die Neuberg und Hirsch[3]) durch Vornahme der Gärung in Gegenwart alkalisch reagierender Salze bewerkstelligt haben.

In allen den genannten Fällen wird lediglich das Spaltungsprodukt der Brenztraubensäure, der Acetaldehyd, charakterisiert, nicht aber die Ketonsäure selber. Die Ursachen dafür sind darin gelegen, daß das zugefügte Reagens sich entweder nicht mit Brenztraubensäure kondensiert, wie das für das Dimedon (Dimethyldihydroresorcin) feststeht, oder daß die Verbindungen zwischen schwefligsauren Salzen und Brenztraubensäure noch glatt zu Kohlendioxyd und dem Aldehyd-Sulfit-Komplex vergoren werden, und zwar tritt diese Reaktion bis zu eben dem Gehalte der Brenztraubensäurelösung an schwefligsauren Salzen ein, der vollkommen dem anwendbaren maximalen Verhältnis zwischen Zucker und sekundären Sulfiten entspricht[4]).

Somit findet man, daß selbst unter erschwerten Umsetzungsbedingungen sich Brenztraubensäure nicht anhäuft, sondern wie Neuberg seit Auffindung der Brenztraubensäuregärung vielfach betont hat, das Bestreben zeigt, ebenso wie ihre Salze im Momente der passageren Entstehung sofort von der Hefe gespalten zu werden. Es mußte daher nach einem Verfahren gesucht werden, das eine radikalere Umwandlung der Brenztraubensäure zu Wege bringt, als es Salzbildung oder die erwähnten Kondensationsreaktionen tun; eine solche Möglichkeit fand sich in der Ver-

---

[1]) C. Neuberg und E. Färber, diese Zeitschr. **78**, 238. 1916. — C. Neuberg und E. Reinfurth, diese Zeitschr. **89**, 365. 1918; **92**, 234. 1918.

[2]) C. Neuberg und E. Reinfurth, diese Zeitschr. **106**, 281. 1920.

[3]) C. Neuberg und J. Hirsch, diese Zeitschr. **96**, 175. 1918; **100**, 304. 1919; vgl. C. Neuberg und W. Ursum, diese Zeitschr. **110**, 193. 1920.

[4]) C. Neuberg und E. Reinfurth, B. **53**, 1050. 1920.

wirklichung der Döbnerschen Synthese[1]). Bekanntlich beruht diese darauf, daß molekulare Mengen von einem aromatischen Amin, z. B. Anilin, Brenztraubensäure, und einem beliebigen Aldehyd sich zu substituierten Cinchoninsäuren kondensieren, gemäß dem Schema:

$$\begin{array}{l} R\cdot CHO \\ \quad + \\ CH_2:C(OH)\cdot COOH \end{array} + H_2N\cdot C_6H_5 = 2\,H_2O + H_2 + \begin{array}{l} R\cdot C:N \\ \;\;|\qquad\diagdown \\ \;\;|\qquad\; C_6H_4 \\ \;\;|\qquad\diagup \\ HC:C\cdot COOH. \end{array}$$

Döbner[2]) hat nun auch gezeigt, daß, wenn kein Aldehyd zugegen ist, die Brenztraubensäure selbst zur Entstehung solcher Cinchoninsäureabkömmlinge Anlaß gibt, indem ein Teil bei der Umsetzung als Carboxy-acetaldehyd reagiert und unter Kohlensäureverlust das gleiche Produkt liefert, welches entstehen würde, wenn man das betreffende Amin mit je einem Molekül Brenztraubensäure und Acetaldehyd zusammengebracht hätte. Diese Synthese verläuft, und das ist im Lichte der vorangegangenen Darstellung ebenfalls von Wichtigkeit, ohne jede Sauerstoffzufuhr, ja sogar unter Abgabe freien Wasserstoffes, also anaerob, und sie ließ sich schließlich unter solchen biologischen Bedingungen verwirklichen, bei denen ein oxydativer Stoffwechsel der Hefe kaum in Betracht kommt, nämlich bei zellfreier Vergärung mit Hilfe von Hefensaft. Döbner hat die Darstellung der verschiedensten Cinchoninsäuren auf der genannten Grundlage ausgeführt und gefunden, daß sie zwar alle nach derselben Regel, aber doch unter abweichenden experimentellen Bedingungen entstehen, indem bald ein längeres Erhitzen der Komponenten in einem geeigneten Solvens nötig ist, bald ein Zusammenbringen in der Kälte genügt. Für den beabsichtigten physiologischen Zweck konnten nur der letztgenannte Verlauf sowie Reagentien in Betracht kommen, die mit dem Zucker selbst sich nicht umsetzen; dementsprechend habe ich auf die Produktion der α-Methyl-β-naphtho-cinchoninsäure hingearbeitet. Diese Verbindung bildet sich nämlich, wie Döbner (l. c.) erwähnt, schon durch Zusammentreffen der Komponenten (1 Mol. β-Naphthylamin, 1 Mol. Brenztraubensäure und 1 Mol. Acetaldehyd bzw. 1 Mol. β-Naphthylamin + 2 Mol. Brenztraubensäure) bei Zimmertemperatur in ätherischer Lösung. Um letztere an-

---

[1]) O. Döbner, Ann. **242**, 265. 1887.

[2]) O. Döbner, B. **27**, 352 u. 2020. 1894.

wenden und die reagierenden Bestandteile in innigsten Kontakt bringen zu können, war das Arbeiten mit Hefepreßsaft notwendig, um so mehr als lebende Hefe nicht die Berührung mit einer ätherischen β-Naphthylaminlösung aushält, wenngleich sie in Suspension zugesetztes festes β-Naphthylamin verträgt. Durch Vornahme der ganzen Prozedur in energisch wirkenden Schüttelapparaten habe ich eine intensive Durchmischung erzielt und in der Tat alsdann die Bildung von α-Methyl-β-naphthocinchoninsäure feststellen können. Ihr Entstehen[1]) ist nicht anders als durch intermediäre Bildung von Brenztraubensäure zu erklären. Es muß dahingestellt bleiben, ob sich an der Synthese außer Brenztraubensäure carboxylatisch abgespaltener Acetaldehyd oder lediglich 2 Mol. Brenztraubensäure beteiligen, ein Punkt jedoch, der für die beabsichtigte Beweisführung ohne Belang ist. Am meisten Mühe hat die Aufarbeitung des Reaktionsproduktes verursacht; es waren Schwierigkeiten zu überwinden, die in der alkaloidähnlichen Natur der Methylnaphthocinchoninsäure begründet sind und die sich deshalb geltend machen, weil unvermeidlicherweise bei der Digestion mit Hefepreßsaft infolge proteolytischer Vorgänge ein Teil des zunächst koagulablen Eiweißes zu löslichen Proteosen und wohl auch zu Aminosäuren abgebaut wird und Spaltungsprodukte der Nucleoproteide auftraten. Wie im Versuchsteile näher dargelegt wird, ging ich so vor, daß ich nach vollkommener, durch Anwendung reichlicher Mengen Hefensaft bewirkter Vergärung des Zuckers den als Lösungsmittel für das β-Naphthylamin benutzten Äther verdunsten ließ, alsdann das gesamte Gemisch bei etwa 36° auf ein kleines Volumen brachte und den Rückstand mit Alkohol, dem einige Tropfen starken Ammoniaks zugesetzt waren, einige Zeit unter Rückfluß im siedenden Wasserbad erwärmte. Hierdurch wird die Entfernung noch vorhandenen gerinnungsfähigen Eiweißes herbeigeführt und gleichzeitig die Methylnaphthocinchoninsäure als Ammonsalz in Lösung gehalten. Das Eiweißkoagulum wurde dann nochmals mit schwach ammoniakalischem Alkohol ausgezogen. Die filtrierten weingei-

---

[1]) Es ist schematisch durch die Formulierung

$$C_6H_{12}O_6 + C_{10}H_7 \cdot NH_2 = 2\,H_2O + CO_2 + 3\,H_2 + C_{15}H_{11}O_2N$$

auszudrücken. Auf ein zu erwartendes Reduktionsprodukt, etwa Glycerin konnte ich wegen der komplizierten experimentellen Bedingungen (s. später) nicht fahnden.

stigen Auszüge wurden verdampft und der Rückstand mit 5 proz. wässerigem Ammoniak aufgenommen, wobei ein Teil der in den Alkohol übergegangenen fremden Bestandteile, ferner auch nicht in Reaktion getretenes β-Naphthylamin unlöslich zurückblieb. Die abermals filtrierte Flüssigkeit wurde von neuem im Vakuum eingeengt und mit wenig Ammoniak enthaltendem Sprit aufgenommen, wobei sie wiederum alkoholunlösliche Beimischungen hinterließ, leider aber neben dem Ammonsalz der Methyl-naphthocinchoninsäure auch braun gefärbte, aus dem Hefesaft hervorgegangene Substanzen sich auflösten. Der Alkoholextrakt wurde darauf vom Weingeist befreit und das Residuum in ganz verdünntem wässerigen Ammoniak aufgenommen. Nach Filtration von Verunreinigungen erfolgte alsdann eine Fällung mit Zinkacetat. Dieses schlug im wesentlichen das Zinksalz der Methyl-naphthocinchoninsäure nieder. Durch Zerlegung mit Salzsäure konnte daraus die Verbindung selbst in freiem Zustande abgeschieden, durch Umkrystallisieren aus 50 proz. Alkohol gereinigt, durch Schmelzpunkt, Analyse sowie Überführung in das Silbersalz und schließlich durch Umwandlung in β-Naphtho-chinaldin[1])

$$\begin{array}{lcl} CH_3 \cdot C & = & N \\ \quad | & & \quad \diagdown \\ & & \quad\quad C_{10}H_6 \\ \quad | & & \quad \diagup \\ HC & = & CH \end{array}$$

identifiziert werden.

Was die Ausbeute anlangt, so ist zu bemerken, daß ich bei Verarbeitung von 180 g Rohrzucker, der vollständig umgesetzt war, im Höchstfalle 7,3 g der α-Methyl-β-naphthocinchoninsäure erhielt. Dieser Ertrag ist nicht groß[2]), aber die Entstehung des Produktes zeigt unzweifelhaft das intermediäre Auftreten von Brenztraubensäure bei der zymatischen Zuckerspaltung an. Daß nicht erheblichere Mengen angehäuft werden können, hängt wohl mit der beträchtlichen Vergärungsgeschwindigkeit der Brenztraubensäure zusammen, die als Zwischenprodukt sogar schneller als der Zucker selbst wieder umgewandelt wird. Hinzu kommt, daß zwar die Synthese der Methylnaphthocinchoninsäure aus den

[1]) O. Döbner und W. v. Miller, B. **17**, 1711. 1884.

[2]) Bei den mehr als Oxydationsgärungen (s. vorher S. 74) abzuschätzenden Versuchen haben Fernbach und Schoen (laut Chem. Centralblatt **1914**. II. 423) nur 1,23% Brenztraubensäure vom Gewichte des angewendeten Zuckers in wirklich reiner Form isoliert.

Komponenten beim Stehen erfolgt, daß aber die Verdünnung sowie die niedere Temperatur ungünstig wirken. Außerdem ist die Isolierungsmethode wohl keine quantitative, auch können (nach Döbners Erfahrungen[1]) die reagierenden Komponenten teilweise noch in anderer Richtung als zum Cinchoninsäurederivat zusammentreten.

Des weiteren habe ich nochmals die Angaben von Fernbach und Schoen mit zwei reinen Kulturhefen, und zwar mit einer obergärigen und mit einer untergärigen Rasse, nachgeprüft; dabei habe ich mich in allen Einzelheiten an die Vorschriften der genannten gehalten und auch den von ihnen als ganz wesentlich hervorgehobenen Gesichtspunkt einer minimalen Aussaat berücksichtigt. Wie ebenfalls aus den experimentellen Belegen hervorgeht, ist es mir nicht geglückt, Brenztraubensäure bei der Kultivierung dieser typischen Erreger in einer ganz mineralischen, mit Kreide versetzten Lösung von Traubenzucker festzustellen. Zwar erhielt ich eine Legalsche Probe, aber sie war in den Ansätzen mit und ohne $CaCO_3$ fast gleich schwach, wennzwar manchmal, aber ohne Regelmäßigkeit, vielleicht ein wenig deutlicher in den calciumcarbonathaltigen Maischen. Aber die allein wesentliche Ausfällung des im Weingeist unlöslichen Calciumpyruvinats, welche die französischen Autoren beschreiben, gelang mir nicht. Die niedergeschlagenen Salze gaben nicht im geringsten eine Reaktion auf Brenztraubensäure, nicht einmal die außerordentlich scharfe Reduktionsprobe mit Tollenscher Silberlösung. Die Unterhefe verbrauchte in der mineralischen Lösung überhaupt nur kleine Mengen Zucker, während die obergärige Rasse davon mehr umsetzte, aber ebenfalls keine Brenztraubensäure erzeugte. Verwendet wurden als Erreger die nach strengen Regeln der Bakteriologie hergestellte Reinzuchtunterhefe der Schultheißbrauerei sowie eine ebensolche von obergäriger Hefe Engelhardt. Auch meine Befunde zeigen, daß mit reinen Erregern der typischen alkoholischen Gärung das Fernbach-Schoensche Phänomen nicht erhalten werden konnte und daß bedauerlicherweise nach ihrem so einfachen Vorgehen die zymatische Bildung von Brenztraubensäure nicht nachweisbar war.

---

[1]) Vgl. auch R. Ciusa und G. Zerbini, Gazz. chim. ital. **50** (II), 317. 1920.

Versuche.

I.

1. Vorversuche.

9 g Zucker, in 100 ccm Wasser von 40° gelöst, wurden mit 10 g obergäriger Hefe versetzt und bei 37° in einen Brutschrank gestellt; 30 Minuten später, nachdem die Kohlensäureentwicklung begonnen hatte, wurden 7 g β-Naphthylamin zugefügt. Nach 24 Stunden war die Gärung nicht erheblich fortgeschritten, so daß noch 20 g Hefe zugegeben wurden; weder diese Nachfüllung noch weitere führten zur vollständigen Umsetzung.

Es wurde also ein neuer Versuch vorgenommen, und zwar wurden 27 g Zucker in 300 ccm Wasser mit 90 g ganz frischer Hefe zusammengebracht. Nach halbstündigem Verweilen im Thermostaten wurden 21 g β-Naphthylamin hinzugegeben. Nach 2 Tagen war der Zucker vergoren (keine Reduktion von Fehlingscher Lösung). Das Gärgut wurde filtriert; aus dem vorsichtig eingedampften Filtrat konnte aber keine α-Methyl-β-naphthocinchoninsäure erhalten werden. Der unlösliche Rückstand wurde mit 5 proz. Ammoniak 10 Minuten auf dem Wasserbad digeriert, darauf wurde von festen Hefebestandteilen abfiltriert, das Filtrat eingeengt und Salzsäure bis zur kongosauren Reaktion zugesetzt. Der dadurch ausgefällte Körper wurde abgesaugt und in warmem, schwach ammoniakalischem Wasser gelöst; dabei blieb β-Napthylamin zurück, dessen Abscheidung durch längeres Stehen im Eisschrank vervollständigt wurde. Alsdann wurde filtriert, das Filtrat mit Tierkohle entfärbt und eingeengt. Die auf kleines Volumen konzentrierte Flüssigkeit ergab jedoch durch Ansäuern nicht den gesuchten Körper. Das β-Naphthylamin hatte also unter diesen Bedingungen — wohl namentlich wegen seiner Unlöslichkeit — nicht nachweisbar in die Vorgänge beim Gärungsverlauf eingegriffen.

So wurde ein neuer Weg beschritten, der nach vielen vergeblichen Versuchen schließlich zu einem Ziele geführt hat, nämlich die Verwendung von Hefesaft und β-Naphthylamin in ätherischer Lösung.

Bezüglich des Hefesaftes bemerke ich, daß er aus einem ursprünglich in Amsterdam heimischen und im Pfefferbergbetriebe weitergezüchtetem Material gewonnen wurde, für dessen Abgabe ich dem Herrn Direktor Sterzbach sehr zu Dank verpflichtet bin. Diese Rasse liefert, was deutsche Hefen bekanntlich nicht allgemein tun, einen gärfähigen Saft; zumal gegenwärtig sind viele Sorten zur Bereitung dieses Gärungsmittels ungeeignet, wohl infolge veränderter, insbesondere eiweißärmerer Ernährung. Mein Saft wies ein besonders gutes Gärvermögen auf. Die Bestimmung der Gärkraft ergab nach der üblichen Methode den Wert 3,03, während Buchner sowie v. Lebedew ehemals 1,87 bzw. 2,67 als selten erreichte Höchstziffern gefunden haben.

Was dieses Material aber vor Zymaselösungen anderer Herkunft, namentlich vor Säften aus leichter autolysierenden Hefen auszeichnete, war seine vergleichsweise geringe proteo- und nucleolytische Betätigung; infolgedessen konnte die Entstehung löslicher Stickstoffverbindungen verhältnismäßig eingeschränkt werden.

Zunächst ließ ich 10 g Zucker mit 180 ccm Saft im Brutschrank angären und das nach Zugabe von 2 g β-Naphthylamin in 30 ccm Äther entstehende Gemenge bei Zimmertemperatur mechanisch stark schütteln. Die Apparatur war dabei so einzurichten, daß die vom gebildeten Kohlendioxyd mitgerissenen Ätherdämpfe leichten Abzug fanden. Dies erreichte ich, indem ich die Gärgefäße (Standflaschen) mit einem durch Gummistopfen aufzusetzenden und entsprechend gebogenen Glasrohr verband, das an der Spitze capillar ausgezogen war. Diese Vorrichtung verhinderte zugleich ein Herausschleudern des Gärgemisches.

Nach 2 Tagen wurde auf Zucker gefahndet. In allen eiweißreichen Lösungen ist, wie Buchner[1]) bestätigt hat, Zucker in Hefesäften nicht ohne weiteres, nach seinen Angaben oft überhaupt nicht nachweisbar. Daher verfuhr ich folgendermaßen: 5 ccm Flüssigkeit wurden herauspipettiert, mit einigen Tropfen Essigsäure versetzt und solange auf dem Wasserbade erwärmt, bis alles Protein koaguliert war. Dann wurde abgesaugt und das Filtrat nach Neubergs Methode mit Mercuriacetat[2]) von löslichen Abbauprodukten des Eiweißes usw. befreit, entquecksilbert und nach Wegkochen des Schwefelwasserstoffes nunmehr mit Fehlingscher Lösung untersucht. Die Probe reduzierte noch stark; deshalb wurden zu dem Ansatz weitere 170 ccm frisch bereiteter Saft gefügt, außerdem 10 ccm Äther nachgefüllt, um das β-Naphthylamin in Lösung zu halten; darauf wurde weiter geschüttelt. Nach 3 Tagen war dann kein Zucker mehr nachweisbar. Nun wurde die Flüssigkeit bei etwa 36° eingedampft und der Rückstand nach Koagulation des Eiweißes, die beim Erwärmen im Wasserbade erfolgte, mit 5 proz. Ammoniak übergossen; nach dem Erkalten wurde vom Niederschlage abfiltriert. Das Filtrat wurde eingeengt, mit Essigsäure versetzt und ohne Berücksichtigung von Ausscheidungen im Vakuum bis fast zur Trockene konzentriert. Der Rückstand wurde mit 75 proz. Alkohol am Rückflußkühler ausgezogen, um das eventuell gebildete Cinchoninsäurederivat in Lösung zu bekommen. Beim Einengen, dem Filtrieren vorausging, fiel ein fester Körper aus; dieser wurde abgesaugt. Das Filtrat ergab nichts. Der Rückstand wurde in 10 proz. Ammoniak gelöst, mit Tierkohle gereinigt, abermals filtriert und dann mit Essigsäure gefällt; es entstand eine bräunliche Substanz, die nach dem Trocknen den Schmelzpunkt 291° zeigte. (Reine α-Methyl-β-naphthocinchoninsäure schmilzt bei 310°.) Wiederholtes Umlösen aus 50 proz. Alkohol führte zu keinem einwandfreien Produkt. Jedenfalls aber wies bereits dieser Versuch daraufhin, daß der eingeschlagene Weg wohl zum Erfolge führen könnte, die Methode aber verbesserungsbedürftig sei. Ich machte also 2 neue Ansätze mit verschiedenen Mengenverhältnissen, um gleichzeitig die erforderliche Quantität β-Naphthylamin festzustellen.

Versuch a): 18 g Zucker in 280 ccm Saft wurden nach erfolgtem Gäreintritt mit 3,6 g β-Naphthylamin, in 55 ccm Äther gelöst, geschüttelt.

Versuch b): 18 g Zucker in 280 ccm Saft wurden mit der doppelten

---

[1]) Buchner und Hahn, Zymasegärung, S. 211 u. 212.

[2]) Siehe bei C. Neuberg, Der Harn, Handbuch. S. 328.

Menge, d. h. mit 7,2 g β-Naphthylamin in 110 ccm Äther, behandelt. Nach 2 Tagen mußten noch je 180 ccm Saft zugesetzt werden, aber auch dann ergab sich nach weiteren 3 Tagen bei Versuch b), daß die große Menge β-Naphthylamin und Äther schädlich gewesen und die Gärung nicht zu Ende gegangen war. Ansatz a) war ausgegoren und wurde bei ca. 35° eingedampft. Der Rückstand wurde in 75 proz. Alkohol aufgeschwemmt und mehrmals am Rückflußkühler extrahiert. Die so erhaltenen alkoholischen Auszüge wurden vom Lösungsmittel befreit; der Rückstand wurde in 5 proz. Ammoniak verteilt, am Wasserbad zur Herauslösung des Reaktionsproduktes kurz erwärmt und über Nacht im Eisschrank belassen. Dann wurde zentrifugiert; die abgegossene klare Flüssigkeit wurde mit Essigsäure versetzt und bei niederer Temperatur eingeengt. Hierbei fiel wieder ein bräunlich gefärbter Körper aus, dessen Reinigung nun auf andere Weise versucht wurde, und zwar mit Bleiacetat. 0,3 g Substanz wurden heiß in 50 ccm 92 proz. Alkohol unter Zusatz von etwas Ammoniak gelöst, dann mit Eisessig sauer gemacht, mit einer hinreichenden Menge Bleiacetat versetzt und filtriert. Unter der Annahme, daß Bleiacetat in essigsaurer Lösung nur Verunreinigungen entferne, α-Methyl-β-naphthocinchoninsäure jedoch in Lösung bleibe, wurde der Niederschlag abgesaugt und ausgewaschen, das Filtrat alsdann mit Schwefelwasserstoff gesättigt. Nach Entfernung des Bleisulfids wurde eingeengt, jedoch kein Reaktionsprodukt erhalten.

Bei einem weiteren Versuche wurden 18 g Zucker mit 760 ccm Saft unter Zusatz von 3,6 g β-Naphthylamin in 55 ccm Äther vergoren. Nach dem Verschwinden des Zuckers und entsprechender Eindickung wurde die zurückgebliebene Masse mit verdünnter Essigsäure (1,5 ccm Essigsäure + 75 ccm Wasser) im Wasserbad erhitzt, um das Eiweiß auszukoagulieren; darauf wurden Flüssigkeit samt Niederschlag ohne weitere Trennung mit geglühtem Seesand zur Trockene gebracht und in einem Soxlethapparat mit Amylalkohol ausgezogen. Der Amylalkohol wurde im Vakuum abdestilliert und der Rückstand erst mit Äthylalkohol, dann mit wässerigem Ammoniak usw. behandelt. Es resultierte ein harziges, unbrauchbares Präparat.

Ein anderer Versuch mit Benzolals Extraktionsmittel schlug ebenfalls fehl.

Der nächste Ansatz wurde mit gleichen Mengen wie früher angestellt und das Gärgut im Perkolator mit gewöhnlichem Sprit ausgezogen. Der nach Abtreiben des Weingeistes verbliebene Rückstand wurde mit warmem 5 proz. Ammoniak digeriert und in der beschriebenen Weise gereinigt. Nach abermaliger Lösung in Alkohol schied sich beim Verdampfen im Vakuumexsiccator eine kleine Menge Substanz krystallinisch aus. Nun wurde versucht, diese Verbindung zu verestern; denn wie Döbner und Kuntze[1]) angeben, ist die nahestehende α-Phenylnaphthocinchoninsäure unter diesen Bedingungen in den Äthylester überführbar. Der Körper wurde in die 50fache Menge absoluten Alkohols eingetragen und getrocknetes Chlorwasserstoffgas bis zur Sättigung eingeleitet. Das Material löste sich dabei

[1]) O. Döbner und P. Kuntze, Ann. **249**, 109. 1888.

bis auf einen spärlichen Rückstand; hierauf wurde eine halbe Stunde am Wasserbad unter Rückfluß gekocht, wobei alles in Lösung ging. Über Nacht krystallisierte eine Substanz aus, die jedoch nicht der gesuchte Ester war; auch aus der tiefdunklen Mutterlauge war er nicht erhältlich.

2. Hauptversuche.

Ich übergehe eine längere Reihe weiterer negativer Experimente und wende mich zur Schilderung der Arbeitsweise, mit der endlich ein Resultat zu verzeichnen war. 18 g Zucker wurden auf die zuvor beschriebene Art mit 1620 ccm Saft unter Zusatz von 3,6 g β-Naphtylamin in 75 ccm Äther vergoren. Nach Verschwinden des Zuckers wurde das Gärgut kurze Zeit im Wasserbade erhitzt und dann bei niederer Temperatur eingeengt; der verbliebene Rückstand wurde mit einem halben Liter absolutem Alkohol, der 5 ccm Ammoniak enthielt, eine Stunde auf dem Wasserbad am Rückflußkühler ausgezogen. Der filtrierte Extrakt, der die Methylnaphtocinchoninsäure enthalten mußte, wurde vom Alkohol befreit und mit 5 proz. wässerigem Ammoniak digeriert. Bei Eiskühlung schied sich dann das überschüssige β-Naphtylamin praktisch vollständig aus und konnte abgesaugt werden. Die Mutterlauge wurde wieder eingedampft und ihr Rückstand mit alkoholischem 5 proz. Ammoniak aufgenommen; von Ausscheidungen filtrierte man ab. Die weitere Reinigung erfolgte sodann über das Zinksalz. Zu dem Zweck wurde die alkoholisch ammoniakalische Flüssigkeit eingedampft und der Rückstand mit schwach ammoniakhaltigem Wasser in Lösung gebracht. Die Ausfällung geschah durch eine Lösung von 15 g Zinkacetat in 50 ccm Wasser und wurde über Nacht stehen gelassen. Der abgesaugte Niederschlag und die Mutterlauge wurden gesondert verarbeitet.

α) Das feste Zinksalz, das gut mit kaltem Wasser ausgewaschen war, wurde in eine Reibschale überführt und mit verdünnter Salzsäure (bis zur Bläuung von Kongopapier) zerlegt. Der jetzt vorhandene Niederschlag wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus 50 proz. Alkohol unter Beigabe von Knochenkohle umkrystallisiert. Das langsam sich ausscheidende Produkt war farblos und schön krystallisiert. Es wurde abgesaugt, mit schwachem Alkohol gewaschen und im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

β) Die Mutterlauge wurde konzentriert und nochmals nach Zugabe einiger Tropfen Ammoniak mit Zinkacetat versetzt. Der nunmehr entstandene Niederschlag wurde wie Niederschlag α) mit

Salzsäure zerlegt; die weitere Behandlung war gleich. Es schied sich abermals ein krystallisiertes Produkt ab.

γ) Die beim Umkrystallisieren aus 50 proz. Alkohol erhaltenen Mutterlaugen wurden eingeengt, mit Tierkohle aufgekocht und wiederum zur Krystallisation hingestellt, wobei noch etwas Substanz ausfiel. Insgesamt erhielt ich so 0,63 g reine Verbindung, welche den Schmelzpunkt 310° zeigte. (Die Bestimmung des Schmelzpunktes erfordert Vorsichtsmaßregeln; es gelangte ein Paraffinbad zur Anwendung, welches durch Rühren gleichmäßig erwärmt werden muß. Hauptsächlich aber ist die Schnelligkeit der Erhitzung maßgebend, da bei zu langsamem Erwärmen Zersetzung eintritt, bei zu raschem keine gleichmäßige Temperatur erzielt wird; ich ging so vor, daß das Thermometer in je 3 Sek. nur 1° stieg.) R. Wegscheider[1]) hat den Schmelzpunkt 290° beobachtet und darauf aufmerksam gemacht, daß außer der Geschwindigkeit des Erwärmens ein eventueller Krystallwassergehalt eine Rolle spielen kann. Die frisch dargestellte α-Methyl-β-naphtocinchoninsäure enthält nämlich 1 Mol. H_2O, das Döbner nicht erwähnt; das Krystallwasser entweicht jedoch bereits bei längerem Aufbewahren der Substanz im Vakuum.

Die Elementaranalyse ergab folgendes Resultat:

0,1436 g Substanz: 0,3993 g CO_2 und 0,0620 g H_2O.
$C_{15}H_{11}NO_2$. Ber.: C = 75,92, H = 4,68%,
gef.: C = 75,86, H = 4,83%.

Es war also kaum ein Zweifel mehr, daß das erhaltene Produkt als α-Methyl-β-naphtocinchoninsäure anzusprechen ist. Zur weiteren analytischen Sicherstellung wurde das Silbersalz bereitet. 0,24 g Substanz wurden in 5 ccm Wasser aufgeschlemmt und in der Hitze mit tropfenweise zugefügtem Ammoniak in Lösung gebracht. Letztere wurde filtriert und mit Silbernitrat ausgefällt, nachdem der Überschuß von Ammoniak zuvor ausgetrieben war. Das Silbersalz fiel sofort aus, wurde abgesaugt und so lange gewaschen, bis Diphenylamin keinen Nitratgehalt der festen Substanz mehr anzeigte; dann wurde letztere im braunen Exsiccator getrocknet. Zur Analyse wurde sie nach Erlangung konstanten Gewichtes in einem Tiegel verglüht.

0,1902 g Substanz gaben 0,0602 g Ag.
$C_{15}H_{10}O_2NAg$: Ber. Ag = 31,39%; gef. Ag = 31,63%.

[1]) R. Wegscheider, M. 17, 115. 1896.

Um nun die Richtigkeit dieser Resultate nochmals zu überprüfen, wurde derselbe Versuch mit zehnfach größeren Mengen angestellt und α-Methyl-β-naphtocinchoninsäure erhalten. Vergoren wurden also 180 g Zucker usw. Die Aufarbeitung erfolgte in der gleichen Weise wie beim vorigen Ansatz nur mit der Vorsichtsmaßregel, daß die auskoagulierte Eiweißsubstanz noch ein zweites Mal mit ammoniakalischem Alkohol extrahiert wurde, um möglichst das gesamte Cinchoninsäurederivat in Lösung überzuführen. Dieser Ansatz lieferte 7,3 g einer bei 308° schmelzenden α-Methyl-β-naphtocinchoninsäure.

0,1606 g Substanz: 0,4450 g CO_2 und 0,0689 g H_2O.
0,1856 g Substanz: 9,4 ccm N (18°, 779 mm).
$C_{15}H_{11}NO_2$. Ber.: C = 75,92%, H = 4,68%, N = 5,90%;
gef.: C = 75,59%, H = 4,80%, N = 5,99%.

Zur weiteren Identifizierung wurde die α-Methyl-β-naphtocinchoninsäure in das β-Naphtochinaldin[1]) übergeführt. Zu diesem Behufe wurden 1,5 g Substanz mit 4,5 g geglühtem Calciumoxyd gemengt und aus einem kleinen Kolben mit niedrig angesetztem Abflußrohr destilliert; dabei ging ein bald erstarrendes Öl über. Aus verdünntem Alkohol wurde die Base in schönen Krystallen rein erhalten; Schmelzpunkt 81°, während für β-Naphtochinaldin 82° verzeichnet wird.

0,1527 g Substanz: 0,4863 g CO_2, 0,0792 g H_2O.
$C_{14}H_{11}N$. Ber.: C = 87,02%, H = 5,74%;
gef.: C = 86,88%, H = 5,80%.

Schließlich wurde aus dem so gewonnenen Naphtochinaldin das Chromat hergestellt, indem die Base mit verdünnter Schwefelsäure in der Wärme klar gelöst und mit wässerigem Kaliumbichromat gefällt wurde. Nach kurzem Stehen wurde das sofort abgeschiedene gelbe Salz abgesaugt und gut gewaschen, bis im Spülwasser keine Schwefelsäure mehr nachweisbar war, dann im Dunkelexsiccator bis zum gleichbleibenden Gewicht getrocknet. Eine Probe wurde im Tiegel verascht und als Cr_2O_3 zur Wägung gebracht.

0,2219 g Chromat gaben 0,0557 g Cr_2O_3.
$(C_{14}H_{11}N)_2H_2Cr_2O_7$. Ber.: Cr_2O_3 = 25,22%;
gef.: Cr_2O_3 = 25,10%.

---

[1]) Döbner und v. Miller, l. c.

II.

Obgleich, wie in der Einleitung hervorgehoben ist, Kerb die Angaben von Fernbach und Schoen über die zymochemische Bildung von Brenztraubensäure in mineralisierten und mit kohlensaurem Kalk versetzten Zuckerlösungen nicht hat bestätigen können, habe ich mit anderen rein gezüchteten Hefestämmen die Versuche wiederholt; dabei folgte ich genau den Angaben der französischen Autoren, insbesondere auch hinsichtlich der Mineralbestandteile sowie der Hefemengen, die sie klein wählten und in der Kulturflüssigkeit wachsen ließen. Verwendet wurde:

1. die untergärige Hefe der Schultheißbrauerei und
2. eine Reinkultur der obergärigen Hefe Engelhardt.

Die angestellten Gäransätze hatten folgende Zusammensetzung:

α) 46,5 g Traubenzucker waren mit 2 g Ammoniumnitrat, 0,5 g Magnesiumsulfat, 0,4 g KH_2PO_4, 0,4 g Ammoniumphosphat, ferner mit Spuren von Zinksulfat, Eisensulfat nebst Kaliumsilicat in 500 ccm Wasser gelöst;

β) in einem anderen Kolben befanden sich 55 g Calciumcarbonat und 500 ccm Wasser.

γ) Der Kontrollansatz enthielt 46,5 g Traubenzucker und, bis auf die Kreide, dieselben anorganischen Salze in 1 l Wasser.

Nach der üblichen Entkeimung wurde der Inhalt der gesondert sterilisierten Kolben α) und β) vereinigt und mit drei Ösen der auf Würzeagar gezüchteten Hefe beimpft. Während in der calciumcarbonatfreien Kontrollprobe γ im Brutschrank bei 29 bis 30° kein Entweichen von Gas zu beobachten war, bemerkte man in Ansätzen mit Calciumcarbonat in der Regel nach 24 Stunden eine geringe Kohlensäureentwickelung. Sie kann aber nach dem Ausfall der weiter unten mitgeteilten Zuckerbestimmung nicht als ein sicheres Zeichen eingetretener Gärung gelten, sondern ist zurückzuführen auf eine partielle Umsetzung des Calciumcarbonats mit den angewandten Ammonsalzen, bei der Ammoniumcarbonat auftritt und infolge Dissoziation etwas Kohlendioxyd abgibt.

Angeführt seien aus der Zahl der vorgenommenen Bestimmungen einige Zuckeranalysen in Ansätzen mit Oberhefe wie Unterhefe, und zwar für die kreidehaltigen und kreidefreien Proben.

1. Ansatz mit Schultheißhefe + $CaCO_3$.

Zuckergehalt	zu Beginn	4,5 %
„	nach 2 Tagen . .	4,5 „
„	„ 6 „ . .	4,45 „
„	„ 10 „ . .	4,5 „
„	„ 14 „ . .	4,35 „
„	„ 22 „ . .	4,35 „

2. Ansatz mit Schultheißhefe ohne $CaCO_3$.

Zuckergehalt	zu Beginn	4,4 %
„	nach 2 Tagen . .	4,4 „
„	„ 6 „ . .	4,3 „
„	„ 10 „ . .	4,35 „
„	„ 14 „ . .	3,95 „
„	„ 22 „ . .	3,9 „

3. Ansatz mit Engelhardthefe + $CaCO_3$.

Zuckergehalt	zu Beginn	4,6 %
„	nach 2 Tagen . .	4,5 „
„	„ 4 „ . .	3,8 „
„	„ 8 „ . .	3,15 „
„	„ 12 „ . .	2,75 „
„	„ 21 „ . .	0,8 „

4. Ansatz mit Engelhardthefe ohne $CaCO_3$.

Zuckergehalt	zu Beginn	4,65 %
„	nach 2 Tagen . .	4,55 „
„	„ 4 „ . .	3,3 „
„	„ 8 „ . .	2,95 „
„	„ 12 „ . .	1,95 „
„	„ 21 „ . .	1,05 „

Alle 24 Stunden wurden steril 2—3 ccm entnommen und mit der Nitroprussidnatriumreaktion auf gebildete Brenztraubensäure untersucht: eine bräunliche Färbung, die auf Essigsäurezusatz in ein schwaches und schnell vergängliches Violett umschlug, trat bei der Oberhefe etwa am elften Tage auf, während sie bei den Kolben mit Unterhefe vollkommen ausblieb. Aber auch bei der erstgenannten Serie war die Reaktion ungemein schwach. Eine zum Vergleich hergestellte Lösung von 0,088 g Brenztraubensäure als Kalksalz in 100 ccm Wasser zeigt eine im Verhältnis dazu starke Legalsche Probe. Hinzu kommt, daß auch in den Ansätzen mit Oberhefe, aber ohne Calciumcarbonat, eine wenn auch vielleicht etwas geringere Farbenreaktion zu erzielen war. Obgleich es bereits danach äußerst zweifelhaft erscheinen mußte, ob

wirklich Brenztraubensäure gebildet wäre, wurden doch 800 ccm (37,2 g angewendetem Zucker entsprechend) eines Ansatzes mit Kreide und Oberhefe nach klarer Filtration im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeengt und die restierende, von Ausscheidungen durch Filtration befreite Lösung unter starkem Rühren in absoluten Alkohol (20faches Volumen) eingetropft, ähnlich wie Fernbach und Schoen vorgehen. Es fiel ein im ersten Augenblick gallertiges Calciumsalz [1]) aus, das beim Stehen konsistenter wurde und nach 24 Stunden abgesaugt werden konnte. Beim Auswaschen mit Alkohol hinterblieb eine gelblichweiße Verbindung, die Calcium, aber auch keine Spur von Pyruvinat enthielt. Die filtrierte wässerige Lösung der Substanz lieferte weder eine Farbenreaktion mit Nitroprussidnatrium noch reduzierte sie ammoniakalische Silberlösung, wozu brenztraubensaure Salze noch in großer Verdünnung befähigt sind. Ein die Legalsche Reaktion gebender Körper fand sich dagegen in der alkoholischen Mutterlauge. Da aber Calciumpyruvinat bei der vorausgegangenen Fällung mit Alkohol hätte niedergeschlagen sein müssen, ist es zweifelhaft, ob der Eintritt dieser Nitroprussidnatriumreaktion überhaupt auf Brenztraubensäure zu beziehen ist. Nicht unerwähnt bleibe, daß ich in dem abgedampften alkoholischen Auszug auch die von Fletcher und Hopkins angegebene Reaktion erhalten habe (Kirschrotfärbung bei Behandlung mit konzentrierter Schwefelsäure, Kupfersulfat und mit alkoholischer Thiophenlösung). Es dürfte sich um Milchsäure (vgl. vorher S. 74) handeln, ohne daß ich deren Vorliegen mit Sicherheit behaupten möchte, da die genannte Probe auch mit anderen Substanzen, wie Apfelsäure, Glykolsäure, Arabonsäure, Gluconsäure, Glucoheptonsäure u. dgl., mehr oder minder deutlich positiv ausfällt, ähnlich übrigens auch mit Brenztraubensäure.

Somit habe ich auch unter Bedingungen einer vita minima, die an sich — wie zuvor auseinandergesetzt worden ist — gar nichts mit der alkoholischen Gärung zu tun hätte, leider keine Bildung von Brenztraubensäure aus Glucose unter der Einwirkung zweier Kulturhefen nachweisen können.

---

[1]) Ziemlich ebenso verhält sich Calciumacetat.

Quantitative Untersuchungen über die Einwirkung einiger Gerinnungsfaktoren auf die Gerinnung des Blutes.

Von

Ludwig Heller.

(Aus der Dermatologischen Abteilung des Wilhelminenspitals in Wien.)

(Eingegangen am 13. Juli 1921.)

I.

Es ist in der Physiologie allgemein bekannt, daß infolge Verdünnung des Blutes die Gerinnung ausbleibt. Obzwar diese Erscheinung zu einer näheren Analyse des Mechanismus der Blutgerinnung geeignet ist, wurde zu diesem Zwecke bis jetzt nicht benützt. Dies ist in erster Linie darauf zurückzuführen, daß man bis zu den letzten Jahren bestrebt war, für die Blutgerinnung eine chemische Erklärung zu geben. Diese Erscheinung weist aber vielmehr auf den Einfluß von physikalisch-chemischen Faktoren bei der Blutgerinnung hin. Sie zeigt nämlich, daß die Blutgerinnung von der Konzentration der wirksamen Substanzen abhängt. Danach war zu allererst zu entscheiden, welche Substanzen bei der Verdünnung des Blutes das Ausbleiben der Gerinnung verursachen. Zunächst habe ich die Wirkung von Ca und von NaCl untersucht, da diese die chemisch charakteristischsten Gerinnungsfaktoren darstellen. Es hat sich auch herausgestellt, daß diese beiden Faktoren von ihrer Konzentration abhängig, sehr stark die Gerinnung des Blutes beeinflussen.

Die allererste Aufgabe mußte sein, beim Menschenblut die Wirkung der Verdünnung auf die Gerinnung zu untersuchen, da diesbezüglich quantitative Daten nicht vorlagen. Ich habe meine Versuche hauptsächlich aus dem Grunde mit menschlichem Blute ausgeführt, weil diese Erscheinung zur Klärung mancher pathologischen Frage beitragen kann. Bis jetzt hat man insbesondere in der Pathologie ziemlich einseitig immer nur die Gerinnungszeit bestimmt. Auf Grund der hier mitgeteilten Ver-

suche wird man erst die mit diesen Methoden beobachteten Differenzen erklären können.

Die Einteilung der Versuche, je nachdem, welcher der erwähnten Faktoren variabel oder konstant gehalten wurde, zeigt Tabelle I.

Tabelle I.

Versuchsanordnung	Bestimmung der	Variabel	Konstant
A	zur Gerinnung notwendigen minimalen:	Blut-Konzentration	Physiol. NaCl
B	desgl.	$CaCl_2$-Konzentration	NaCl: 0,5 % Blut { 1 : 150, 1 : 200, 1 : 400, 1 : 600
C	zur Gerinnung günstigen:	NaCl-Konzentration	$CaCl_2$: 0,01 % Blut: 1 : 200
D	zur Gerinnung notwendigen minimalen:	Blut-Konzentration	CaCl: 0,05 % NaCl: 0,5 %

II. Methodik.

A. Versuche nach der Versuchsanordnung A. (Versuche 1, 2, 3.)

Der Versuch 1 wurde folgendermaßen durchgeführt: Das Blut, ca. 2—3 ccm, wurde mittels einer ca. 5 cm langen Punktionsnadel, deren Lumen einen Durchmesser von ca. 1 mm besaß, aus der Vena mediana in üblicher Weise gewonnen, in einer ca. 6—7 ccm fassenden Eprouvette aufgefangen. Gleich nach der Entnahme wurde das Blut in die schon vorher mit den notwendigen Mengen von physiologischer NaCl-Lösung beschickten Eprouvetten eingefüllt. Die Ablesung der Resultate ist nach 24 Stunden langem Stehen bei Zimmertemperatur erfolgt. In den mit + bezeichneten Röhrchen war ein in der Flüssigkeit suspendiertes Gerinnselnetz, bestehend aus roten Blutkörperchen und aus ausgefallenem Fibrin, wahrnehmbar. Der andere Teil der roten Blutkörperchen hat sich gesetzt, war aber durch Schütteln wieder vollkommen zu suspendieren. In den mit — bezeichneten Röhrchen haben sich sämtliche rote Blutkörperchen gesetzt und waren durch Schütteln restlos zu suspendieren. Alles andere ist aus der Tabelle ersichtlich.

Die Ausführung des 2. Versuches unterscheidet sich von der des 1. dadurch, daß bei dem 2. statt des unverdünnten Blutes ein mit physiologischer NaCl-Lösung im Verhältnis von 1 : 4 verdünntes Blut als Ausgangslösung verwendet wurde. Die Ergänzung folgte gleichfalls mit physiologischer NaCl-Lösung.

Der 3. Versuch unterscheidet sich von dem 1. dadurch, daß bei dem erstgenannten ein mit physiologischer NaCl-Lösung in einem Verhältnis von 1 : 9 verdünntes Blut als Ausgangslösung verwendet wurde. In dieser

Verdünnung verweilten die Blute vor der Einfüllung nicht alle gleichlange Zeit hindurch, ca. $^3/_4$—$1^1/_4$ Stunden.

B. Versuche nach der Versuchsanordnung B. (Versuche 14, 22, 23, 24, 29, 30.)

Der 14. Versuch wurde folgendermaßen durchgeführt: Das Blut, ca. 2 ccm, wurde mittels einer schon beschriebenen Punktiernadel aus der Vena mediana entnommen und in einer einparaffinierten kleinen Serumeprouvette aufgefangen. Ein Teil des Blutes wurde dann mit einer einparaffinierten Pipette mit physiologischer NaCl-Lösung im Verhältnis 1 : 75 verdünnt. Noch vor der Blutentnahme wurden für jedes Blut, das zur Untersuchung gelangte, 12 kleine, ca. 8 ccm beinhaltende Serumröhrchen folgendermaßen vorbereitet: Jeder der 12 Eprouvetten enthielt 2 ccm Flüssigkeit. In dieser Flüssigkeit waren NaCl und $CaCl_2$ gelöst enthalten. Während die Konzentration des NaCl in allen Eprouvetten gleich blieb, war $CaCl_2$ in den 12 Eprouvetten in absteigender Konzentration gelöst. Die Konzentrationswerte von $CaCl_2$ waren folgende: 0,0005%, 0,001%, 0,002%, 0,004%, 0,006%, 0,008%, 0,01%, 0,012%, 0,014%, 0,016%, 0,018%, 0,02%. — Die Konzentrationswerte der entsprechenden Tabelle sind nur halb so groß, da zu den Lösungen von 2 ccm, wie später noch auseinandergesetzt wird, noch 2 ccm verdünnte Blutlösung hinzugefügt werden. In jede der 12 Eprouvetten wurden nun je 2 ccm der soeben 1 : 75 verdünnten Blute eingefüllt. (Vor der Einfüllung wurde das verdünnte Blut durch Zustopfen und Umdrehen der Eprouvette gut gemischt.) Zur Verdünnung der einzelnen Blutproben wurde dieselbe paraffinierte Pipette, nach dem Gebrauch mit Oleum paraffini durchgespült, verwendet. Die Ablesung der Versuchsresultate erfolgte nach 24 Stunden langem Stehen bei Zimmertemperatur. In den mit + bezeichneten Röhrchen befand sich ein aus Fibrin und roten Blutkörperchen bestehendes Gerinnselnetz. In dem mit $+_0$ bezeichneten Röhrchen hat das Gerinnselnetz keine roten Blutkörperchen enthalten. Da ist die Gerinnung also erst nach der vollständigen Senkung der roten Blutkörperchen eingetreten, was, eine gleichmäßige Senkungszeit angenommen, den späteren Eintritt der Gerinnung bedeutet. (Es ist dabei zu bemerken, daß bei Lues die Sedimentierung der roten Blutkörperchen schneller vor sich gehen soll.) In den mit — bezeichneten Röhrchen war kein Gerinnsel zu finden.

Die Versuche 22, 23 und 24 wurden wie folgt durchgeführt: Vorbereitungen: Die Eprouvetten, kleine Serumröhrchen mit ca. 8 ccm Inhalt, die zum Auffangen des Blutes dienen sollten, wurden mit ca. 2 ccm Oleum oliv. steril. beschickt. Das Öl wurde durch Umgießen in ein anderes Röhrchen nebst ständigem Drehen der Eprouvette an der Wand derselben verteilt. Nachher setzt sich der größte Teil des Öles ab, die Wand des Gefäßes wird aber mit einer dünnen Schicht Öl überzogen. Auf diese Weise wurden so viele Röhrchen präpariert als Blute bei dem betreffenden Versuche zur Untersuchung kamen. Ebensoviel große Eprouvetten, mit einem Inhalt von über 30 ccm, wurden mit je 29,7 ccm destilliertem Wasser beschickt.

Ebensovielmal 10 kleine Röhrchen (die beschriebenen Serumröhrchen oder auch Wassermannröhrchen) wurden folgendermaßen mit Lösungen beschickt: Aus einer Lösung, die 0,02% $CaCl_2$ und 1% NaCl beinhaltete, wurden folgende, auch in der Tabelle ersichtliche Mengen, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 und 1,5 ccm eingefüllt. Diese wurden dann mit einer 1 proz. NaCl-Lösung auf 2 ccm ergänzt. Dann wurden 2 ccm Pipetten (0,01 grad.) in genügender Zahl (als Blute zur Untersuchung kamen) $^1/_4$ Stunde vor dem Anfang der Blutentnahme in dem Zwischenfenster des Zimmers aufbewahrt. (Die Temperatur betrug da ca. 10—15° C.) Das Zwischenfenster sollte mangels eines Eisschrankes, diesen ersetzen. Die zur Blutentnahme verwendete Straussche Kanüle wurde mit destilliertem Wasser und mit Alkohol gereinigt und in destilliertem Wasser ausgekocht. Auf Abkühlenlassen der Kanülen vor dem Gebrauch auf Zimmertemperatur wurde geachtet. Die Kanüle wurde vor dem Gebrauch von den darin noch haftenden Wassertröpfchen durch energisches Schütteln befreit. Die zum Auffangen des Blutes verwendeten, mit Öl beschickten Röhrchen wurden unmittelbar vor dem Gebrauch mit ihrer Längsachse in der Horizontalen gehalten, über ihre Längsachse herumgedreht, damit ihre Wand mit einer Ölschicht bedeckt würde. Das Blut, ca. 2—3 ccm, wurde dann aus der Vena mediana cubiti entnommen und in der geölten Eprouvette aufgefangen. Es wurde nur Blut, das gleich aus dem ersten Stich ausgeflossen ist, verwendet. Bei einer eventuell mißglückten Punktion, wenn z. B. das Blut nach 1—2 Tropfen aufhörte zu fließen, wurde die Punktion an anderer Stelle, eventuell an dem anderen Arm, wiederholt. Die Punktion hat natürlich mittels der Straussschen Kanüle nur einige Sekunden lang gedauert. Aus dem frischgewonnenen Blute wurde sogleich in eine aus dem Zwischenfenster herausgeholte Pipette bis zum Zeichen 1,7 (0,3 ccm) aufgezogen (behutsam, damit keine störenden Luftblasen entstehen und kein Öl mit aufgezogen werden kann) und der entsprechenden großen Eprouvette, die 29,7 ccm destilliertes Wasser enthalten hat, zugeführt. Dabei ist das Blut mit der Wand der Eprouvette nicht in Berührung gekommen, sondern direkt in das dest. Wasser geraten. Nachher wurde das in solcher Weise in einem Verhältnis von 1 : 100 verdünnte Blut durch Zustopfen und Umdrehen der großen Eprouvette gut gemischt. Aus diesem verdünnten Blut wurden dann in die 12 obenbeschriebener Weise vorbehandelten Eprouvetten je 2 ccm eingefüllt. Die Versuchsanordnung ist aus der Tabelle ebenfalls klar ersichtlich. Die in der Tabelle angegebenen Konzentrationswerte beziehen sich einerseits auf das Reaktionsvolumen, andererseits auf die zugegebene Menge von NaCl bzw. $CaCl_2$. Bei diesen Zahlenwerten ist also der Inhalt des Blutes an NaCl und $CaCl_2$ nicht in Betracht gezogen. Die Art der Blutentnahme durch Straussche Kanülen, Auffangen des Blutes in geölten Eprouvetten usw. sind bei allen folgenden Versuchen in obengeschilderter Weise durchgeführt worden.

Eventuelle Differenzen sind an der betreffenden Stelle betont.

Die Ablesung der Versuche erfolgte nach 24 Stunden langem Stehen bei Zimmertemperatur, und zwar in folgender Weise: Das betreffende Röhrchen wurde mit einem Gummistöpsel zugestopft und 2 mal umgedreht.

Während und nach diesem Umwerfen wurde der Inhalt der Eprouvette beobachtet. In dem mit + bezeichneten Röhrchen haben sich die auf die Stromata der roten Blutkörperchen ausgefallenen Fibrinfäden zu einem Gerinnselstückchen zusammengeballt. Es ist dabei zu bemerken, daß bei den Versuchen, wo Serumröhrchen, die einen kleinen Durchmesser besaßen und nicht Wassermannröhrchen, angewendet wurden, dieses Herausspringen und Zusammenballen der Fibrinfäden besser und schöner zur Beobachtung kam. Diese Differenz wäre so zu erklären, daß in den langen, schmalen Röhrchen bei einer gleichen Flüssigkeitsmenge die Stromata eine längere Zeit zur Senkung brauchen als in den breiteren Wassermannröhrchen. Infolgedessen werden sie in größeren Massen in das Gerinnsel miteingeführt. In den mit ± bezeichneten Röhrchen war das Gerinnsel bedeutend kleiner, in den mit ∸ bezeichneten Röhrchen waren nur Spuren von Fibrinfäden zu sehen. Eventuelle Verunreinigungen können bei präziser Beobachtung leicht von den Fibrinfäden unterschieden werden. In den mit — bezeichneten Röhrchen waren keine Fibrinfäden zu finden.

Die Blutentnahme und Ablesung bei den Versuchen 29 und 30 (Blutverdünnung 1 : 400 bzw. 1 : 600) erfolgte auch in der obengeschilderten Weise. Die Blutproben stammen bei den genannten 2 Versuchen von denselben 3 Patienten.

C. Versuch nach der Versuchsanordnung C. (Versuch 26.)

Der 26. Versuch bezweckt, festzustellen, innerhalb welcher NaCl-Konzentration bei einer $CaCl_2$-Konzentration von 0,01% und bei einer Blutkonzentration von 0,5% (1 : 200) die Gerinnung stattfindet. Der Versuch wurde mit einer Mischung von 1: 100 verdünntem Blute (destilliertem Wasser) von 3 hämatologisch gesunden Patienten durchgeführt. Blutentnahme wie früher. Die Blutproben verweilten im verdünnten Zustande (1 : 100) 3 Stunden lang bei Zimmertemperatur.

D. Versuche nach der Versuchsanordnung D. (Versuche 31, 32, 33, 34.)

Nachdem in dem Stadium der Untersuchungen, wo das Blut mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt wurde, festgestellt werden konnte, daß das normale Blut nebst Zugabe von 0,05% CaCl bis zu einer Verdünnung von ca. 1 : 800 Gerinnung zeigt, wurden die Blutkonzentrationen bei den hier mitgeteilten Versuchen (31, 32, 33, 34) in der Nähe dieser Grenze gewählt. Diese Versuche sind untereinander in dem Sinne, wie es z. B. bei dem 22., 23. und 24. Versuche möglich ist, nicht zu vergleichen. Das wurde bei diesen auch nicht angestrebt. Es sind nämlich in der Ausführung genannter Versuche Differenzen, die Vergleiche unmöglich machen. Die Blutproben der einzelnen Versuche verweilten verschieden lange Zeit, 1—3 Stunden, hindurch in verdünntem, und zwar auch in verschiedenem Grade verdünntem (1 : 100, 1 : 200) Zustand bei Zwischenfenstertemperatur. Die Ausgangsverdünnung ist auch eine verschiedene gewesen (1 : 100, 1 : 200). Es waren auch in der Reihenfolge der Einfüllung der einzelnen Reagentien bei den verschiedenen Versuchen Differenzen. Selbstverständlich waren all die genannten Umstände innerhalb desselben Versuches vollständig gleich.

Blutentnahme, Ablesung usw. wie früher. Die Versuchsanordnung ist aus der Tabelle ersichtlich.

III. Ergebnisse.

A. Bestimmung der zur Gerinnung notwendigen minimalen Blutkonzentration.

Tabelle II.

Versuch 1.

Diagnose	Die Menge des eingefüllten Blutes in ccm				
	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6
Peliosis reum + Lues l.	—	—	+	+	+
Pediculosis	—	—	+	+	+

Versuch 2,

Diagnose	Die Menge des eingefüllten Blutes in ccm			
	0,1	0,14	0,2	0,24
Nihil	—	—	+	+
Lues	—	—	+	+

Versuch 3.

Diagnose	Die Menge des eingefüllten Blutes in ccm					
	0,1	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20
In Observatione	—	—	—	±	+	+
Lues latens	—	—	—	+	+	+
Impetigo cont.	—	—	—	—	—	—
Sklerose	—	—	—	—	—	—
Scabies	—	—	—	—	—	+
Ekzem	—	—	—	—	—	—

Bei diesen drei Versuchen wurden die angegebenen Blutmengen mit phys. NaCl-Lösung auf 2 ccm ergänzt.

Das normale Blut gerinnt bis zu einer Verdünnung von ca. 1 : 10, bei weiterer Verdünnung nicht mehr.

Die zur Gerinnung notwendige minimale Blutkonzentration ist also, angenommen daß die Gerinnung, nach 24stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur, bei der angegebenen Versuchsanordnung vollständig abläuft, ca. 10%. (Daß in dem 3. Versuche einige Blutproben in der Verdünnung 1 : 10 nicht mehr gerinnungsfähig waren, ist nach meiner Erfahrung dadurch zu erklären, daß durch längeren Aufenthalt bei Zimmertemperatur in verdünnten Lösungen die Gerinnungsfaktoren abgeschwächt werden.)

B. Bestimmung der zur Gerinnung notwendigen minimalen $CaCl_2$-Konzentration.

Tabelle III (Versuche Nr. 14, 22, 23, 24, 29, 30).

Versuch 14.

Diagnose	Konzentr. des $CaCl_2$ in Prozentzahl			
	0,00025	0,0005	0,001	0,002
Lues I.	+	+	+	+
Lues II	+	+	+	+
Lues I. + Ikterus . . .	–	–	+	+
Lues I.	+	+	+	+
Nihil	$+_0$	+	+	+
Lues II	+	+	+	+

Da wurde zur Lösung von $CaCl_2$ (von entsprechender Konzentration) je 2 ccm 1 : 75 verdünntes Blut zugefügt.

Versuch 22.

Diagnose	Konzentration des $CaCl_2$ in Prozentzahl								W. R.
	0,004	0,0045	0,005	0,0055	0,006	0,0065	0,007	0,0075	
Epididymitis gon. .	–	–	–	+	+				neg.
Sklerose	–	–	–	±	+				"
Epididymitis gon. .	–	–	–	+	+				"
Scabies, Lues I. . .	–	–	–	–	+				"
Lues II	–	–	–	–	+				pos.
Phimose	–	–	–	–	+				neg.
Lues II	–	–	+	+	+				pos.
Versuch 23.									
Ikterus + Lues I. .	–	–	–	–	–	–	–	±	—
Aortitis luetica . .	–	–	–	+	+	+	+	+	—
Sklerose	–	–	–	+	+	+	+	+	neg.
Nihil	–	+	–	+	–	+	+	+	"
Lues II	–	–	–	+	+	+	+	+	pos.
Gonorrhöe	–	–	–	+	+	+	+	+	neg.
Scabies	–	–	+	+	+	+	+	+	"
Scorbut	–	–	±	+	+	+	+	+	—
Versuch 24.									
Ulcus molle, Bubo .	–	±	±	+	+	+	+		neg.
Lues	–	–	–	+	+	+	+		"
Lues I. Reste von Ikterus	–	–	–	±	–	+	+		pos.
Lues	–	–	±	+	+	+	+		"
Lues II	–	–	–	+	+	+	+		—
Ekzem	–	+	+	+	+	+	+		neg.
Gonorrhöe	–	–	+	+	+	+	+		"
Lues	–	–	+	+	+	+	+		pos.
In Observatione . .	–	–	–	+	+	+	+		neg.
Scabies	–	–	–	+	+	+	+		"

0,8—1.5 ccm Lösung A., mit 1 proz. NaCl-Lösung auf 2 ccm ergänzt + 2 ccm 1 : 100 verdünntes Blut. Lösung A ist auf $CaCl_2$ 0,02 proz., auf NaCl 1 proz.

Versuch 29.

Diagnose	Konzentration des $CaCl_2$ in Prozentzahl								W. R.
	0,015	0,02	0,025	0,03	0,035	0,04	0,045	0,05	
Ikterus + Lues . .	—	—	—	—	±	+	+	+	
Lues II Papulae . .	—	—	+	+	+	+	+	+	pos.
Scabies	—	—	±	±	±	±	+	+	neg.

0,3—1 ccm aus Lösung C mit einer 1 proz. NaCl-Lösung auf 2 ccm ergänzt + 2 ccm 1 : 200 verdünntes Blut.

Versuch 30.

Diagnose	Konzentration des $CaCl_2$ in Prozentzahl								W. R.
	0,015	0,02	0,025	0,03	0,035	0,04	0,045	0,05	
			—	—	—	±	—	+	
			—	—	+	±	+	+	
			—	—	—	—	—	—	

Versuchsanordnung wie bei Versuch 29, mit dem Unterschiede, daß da 2 ccm 1 : 300 verdünntes Blut eingefüllt wurde. Lösung C ist auf $CaCl_2$ 0,2 proz., auf NaCl 1 proz..

Das Prinzip der Versuchsanordnung: Bei gleicher Blut- und NaCl-Konzentration ist die zur Gerinnung notwendige minimale $CaCl_2$-Konzentration zu bestimmen. Diese gleiche Blutkonzentration kann, wie aus den Versuchen zur Versuchsanordnung A. ersichtlich ist, von der Verdünnung 1 : 10 an bis, wie das aus später mitzuteilenden Versuchen (s. Tabelle IV) ersichtlich, zu einer Verdünnung von ca. 1 : 800 frei gewählt werden. Innerhalb enger Grenzen kann auch die NaCl-Konzentration frei gewählt werden.

Derzeit verfüge ich über Versuche, bei welchen die Blutkonzentration 1 : 150, 1 : 200, 1 : 400 und 1 : 600 betrug. Am ausführlichsten sind unter diesen die Versuche bei der Blutverdünnung 1 : 200, nebst einer NaCl-Konzentration von 0,5% durchgeführt worden.

Ergebnisse des 14. Versuches:

1. Die minimale $CaCl_2$-Konzentration, die bei der angegebenen Versuchsanordnung nebst Zufügung von 0,5% NaCl zu dem normalen, 1 : 150 verdünntem Blut zugefügt werden muß, damit eine Gerinnung eintreten kann, beträgt weniger als 0,00025% des Reaktionsvolumens.

2. Bei den untersuchten 5 luischen Blutproben ist die Gerinnung früher eingetreten als bei dem Normalblut. Bei den luischen Blutproben haben sämtliche Röhrchen ein Gerinnsel aus Fibrin

und aus roten Blutkörperchen bestehend enthalten. In dem ersten Röhrchen von minimaler $CaCl_2$-Konzentration bei Blut einer gesunden Person dagegen wurden keine roten Blutkörperchen in dem Gerinnsel mitgefaßt.

3. Bei dem Fall von hochgradigem Ikterus + Lues latens macht die zur Gerinnung notwendige minimale $CaCl_2$-Konzentration 0,001 aus, bei allen anderen dagegen ist sie kleiner als 0,00025%.

Ergebnisse der Versuche 22, 23, 24.

Die Ergebnisse dieser 3 an verschiedenen Tagen mit Blutproben von Patienten verschiedenen Alters beider Geschlechter und zu verschiedenen Tageszeiten (von 11 bis 1 Uhr mittags) angestellten Versuche können folgenderweise zusammengefaßt werden:

1. Die minimale $CaCl_2$-Konzentration, die bei der angegebenen Versuchsanordnung nebst Zufügung von 0,5% NaCl zu dem normalen, 1 : 200 verdünnten Blut zugefügt werden muß, damit eine Gerinnung eintreten kann, beträgt 0,005—0,006% des Reaktionsvolumens. Obzwar die äußeren Umstände wegen Mangels an Thermostat und Eisschrank nicht vollständig gleich einzustellen waren, ist es doch möglich gewesen, eine ziemlich scharfe Grenze festzustellen. Es ist anzunehmen, daß bei gleichbleibenden äußeren Umständen gleiche Werte für die Gerinnungsfähigkeit des normalen Blutes festzustellen wären. Gleiche Umstände könnte man dadurch schaffen, daß man zur Verdünnung des Blutes eine auf 0° abgekühlte Pipette gebrauchen und den Versuch bis zum vollständigen Ablauf desselben bei konstanter, für die Gerinnung günstiger Temperatur durchführen würde.

2. In einem Falle von langdauerndem Ikterus ist bedeutende Herabsetzung der Gerinnungsfähigkeit konstatiert worden (Versuch 23). Die zur Gerinnung notwendige minimale $CaCl_2$-Konzentration ist in einem Falle von Ikterus bei Lues latens 0,0075%, bei normalem Blut 0,0055%.

Ergebnisse des 29. Versuches:

1. Die zur Gerinnung notwendige minimale $CaCl_2$-Konzentration bei einer Blutverdünnung von 1 : 400 nebst der angegebenen Versuchsanordnung beträgt beim Normalblut ca. 0,035% des Reaktionsvolumens.

2. Die zur Gerinnung notwendige minimale $CaCl_2$-Konzen-

tration bei dem luetischen Blut (Lues II-Papeln, WaR. pos.) beträgt 0,025% des Reaktionsvolumens.

Ergebnisse des 30. Versuches:

1. Die zur Gerinnung notwendige minimale $CaCl_2$-Konzentration bei einer Blutverdünnung 1 : 600 nebst der angegebenen Versuchsanordnung beträgt bei dem Normalblut mehr als 0,05% des Reaktionsvolumens, dieselbe bei dem luischen Blut 0,035%.

C. Bestimmung der zur Gerinnung günstigen NaCl-Konzentration.

Tabelle IV.

Versuch 26.

Konzentration des NaCl in Prozentzahl										
0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
F	F	F G	G	G	G	Tr G	Tr	Tr	Tr	Tr

0,0—1,0 ccm Lösung A ergänzt mit einer 0,02 proz. $CaCl_2$-Lösung auf 3 ccm + 3 ccm 1 : 100 verdünntes Blut. Lösung A ist auf NaCl 6 proz., auf $CaCl_2$ 0,02 proz. F = Fällung; G = Gerinnsel; Tr = Trübung.

Ergebnisse des 26. Versuches:

Nebst einer 0,5 proz. Blut- und nebst einer 0,01 proz. $CaCl_2$-Konzentration findet die Gerinnung bei einer NaCl-Konzentration von 0,2% bis 0,6% statt. Dieses Ergebnis stimmt mit folgender Beobachtung überein: Bei den Versuchen, die ich zur Methode B, bei einer Blutverdünnung von 1 : 200 und bei $CaCl_2$-Konzentration, wie in den Versuchen 22, 23, 24, weiter bei NaCl-Konzentration von 1% aufgestellt habe, ist keine Gerinnung eingetreten.

D. Bestimmung der zur Gerinnung notwendigen minimalen Blutkonzentrationen bei gleichbleibender und zur Gerinnung ausreichender NaCl- und $CaCl_2$-Konzentration.

Tabelle V.

Versuch 31.

Diagnose	Blutverdünnung									W. R.
	1 : 800	1 : 727	1 : 666	1 : 615	1 : 571	1 : 533	1 : 500	1 : 470	1 : 444	
Ikterus + Luesl.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	neg.
Lues II . . .	—	—	+	+	+	+	+	+	+	pos.
Scabies	—	—	—	—	—	±	+	+	±	neg.

0,5—0,9 ccm 1 : 100 verdünntes Blut mit destilliertem Wasser auf 2 ccm ergänzt + 2 ccm aus einer Lösung, die auf $CaCl_2$ 0,1 proz., auf NaCl 1 proz. war.

Versuch 32.

Diagnose	1:4000	1:2666	1:2000	1:1600	1:1333	1:1143	1:1000	1:888	1:800	1:727	1:666	1:615	W. R.
	Blutverdünnung												
Lues I.	—	—		—	—	—	+	+	+	+	+	+	pos.
Ikterus + Lues I.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	+	neg.
Gonorrhöe	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	"
Sklerose	—	—	—	—	+	+	—	+	+	+	+	+	pos.
Versuch 33.													
Rec. Lues Papulae		·	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	pos.
Roseola syphil.	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	"
Impetigo capitis	—	—	—	—	—	—	+	—	+	+	+	+	neg.
Lues I. Gonorrhöe	—	—	—	—	—	+	—	+	+	+	+	+	"
Scabies	—	—	—	—	—	+	·	+	+	+	+	+	"
Versuch 34.													
Impetigo cont.	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	neg.
Scabies	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	"
Lues II Papulae	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+	+	
Portiosklerose	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	fragl. pos.

0,2—1,3 ccm 1:200 verdünntes Blut, mit destilliertem Wasser auf 2 ccm ergänzt + 2 ccm aus einer Lösung, die auf $CaCl_2$ 0,1 proz., auf NaCl 1 proz. war.

Vor Besprechung der Versuchsresultate sollen hier die Verdünnungsgrenzen, bis zu welchen noch Gerinnung bei den verschiedenen Blutproben eingetreten ist, angeführt werden.

		Diagnose	Verdünnung, bei welcher noch Gerinnung eintritt
Versuch 31:	1.	Ikterus, Lues latens weiter als bis	1 : 444
	2.	Scabies	1 : 500
	3.	Lues II. Papulae WaR. pos.	1 : 666
Versuch 32:	1.	Gonorrhöe	1 : 800
	2.	Ikterus, Lues latens	1 : 666
	3.	Lues latens WaR. pos.	1 : 1000
	4.	Sklerose, Lymph. ingu. WaR. pos.	1 : 1332
Versuch 33:	1.	Impetigo capitis	1 : 1000
	2.	Scabies	1 : 1143
	3.	Lues I, Gonorrhöe	1 : 1143
	4.	Roseola syphilitica WaR. pos.	1 : 2000
	5.	Rec. Lues Papulae ad genitale WaR. pos.	1 : 2000
Versuch 34:	1.	Impetigo contagiosa	1 : 888
	2.	Scabies	1 : 666
	3.	Portiosklerose WaR. fraglich pos.	1 : 800
	4.	Lues II. Papulae WaR. nicht untersucht	1 : 1000

Ergebnisse:

1. Wie aus der obigen Zusammenstellung ersichtlich, sind die Verdünnungswerte, bei welchen noch bei den Normalblutproben (von Patienten herstammend, die weder Lues noch Ikterus gehabt haben) Gerinnung eingetreten ist, folgende: 1 : 500, 1 : 800, 1 : 1000, 1 : 1143, 1 : 888, 1 : 666. Bei den Luesfällen (mit Erscheinungen und mit positiver WaR.) sind die entsprechenden Werte: 1 : 666, 1 : 1332, 1 : 2000, 1 : 2000, 1 : 1000. Minimale bzw. maximale Werte bei Normalblut: 1 : 500 bzw. 1 : 1143; bei Lues: 1 : 666 bzw. 1 : 2000. Durchschnittswerte bei Normalblut: 1 : 821; bei Lues: 1 : 1333. Das Verhältnis der Durchschnittswerte: 1,62.

2. Bei 2 Fällen von leichterem Ikterus + Lues latens ist der Verdünnungswert, bei welchem noch Gerinnung eingetreten ist, etwas niedriger als bei Normalblutproben des entsprechenden Versuches. (Herabsetzung der Gerinnungsfähigkeit bei Ikterus.)

3. In den Versuchen 31, 32, 33, 34 zeigt sich mit einer ziemlich großen Regelmäßigkeit eine paradoxe Erscheinung; die stufenweise Herabsetzung bzw. Ausbleiben der Gerinnung in den Röhrchen, die etwas höhere Blutkonzentration enthalten, als die zur Gerinnung notwendige minimale ist. Wodurch diese Erscheinung hervorgerufen wird, ist mir bisher unklar geblieben. (Es käme die Möglichkeit in Betracht, daß die Gerinnung auch in diesen Röhrchen eingetreten, aber bis zur Ablesungszeit wieder aufgelöst worden ist. Es müßten da natürlich zur Auflösung des Gerinnsels die günstigsten Verhältnisse vorhanden sein.)

Zusammenfassung.

α) Normalblut.

Es wurde die zur Gerinnung notwendige minimale Blut-, $CaCl_2$- und die zur Gerinnung ausreichende NaCl-Konzentration bestimmt, weiters die zur Gerinnung notwendige minimale Blutkonzentration bei gleicher und zur Gerinnung ausreichender $CaCl_2$- und NaCl-Konzentration festgestellt. Dabei hat sich ergeben:

a) Die zur Gerinnung notwendige minimale Blutkonzentration ist ca. 10 proz.

b) Die zur Gerinnung notwendige minimale $CaCl_2$-Konzentration bei einer Blutverdünnung von 1 : 200 ist ca. 0,005—0,006%

Bei höherer Blutkonzentration ist die zur Gerinnung notwendige minimale $CaCl_2$-Konzentration niedriger, bei niederer Blutkonzentration höher.

c) Nebst einer 0,5 proz. Blut- und nebst 0,01 proz. $CaCl_2$-Konzentration findet die Gerinnung bei einer NaCl-Konzentration von 0,2—0,6% statt.

d) Bei 0,05% $CaCl_2$- und 0,5% NaCl-Gehalt ist die Verdünnungsgrenze des Blutes, bei welcher noch Gerinnung eintritt, ca. 1 : 800.

Selbstverständlich sind diese Werte keine absoluten Werte. Bekanntlich üben auf die Gerinnung viele äußere Faktoren einen bedeutenden Einfluß aus. Infolgedessen sind diese Werte von der angewendeten Methodik abhängig. Durch die Versuchsanordnung B (Bestimmung der zur Gerinnung notwendigen minimalen $CaCl_2$-Konzentration) ist es doch gelungen, an den verschiedenen Tagen ziemlich übereinstimmende Werte zu erhalten (siehe Tab. II).

β) Ikterus.

Bei 2 Fällen von hochgradigem Ikterus waren bei der Versuchsanordnung B. die zur Gerinnung notwendigen minimalen $CaCl_2$-Konzentrationswerte bedeutend höher als beim Normalblut. Bei 2 leichteren Ikterusfällen war bei der Versuchsanordnung D. die zur Gerinnung notwendige minimale Blutkonzentration etwas höher als bei dem Normalblut. Die Versuchsanordnungen waren also geeignet, die bekannte Herabsetzung der Gerinnungsfähigkeit des ikterischen Blutes anzuzeigen [Übereinstimmung mit Petrens[1]) Untersuchungen].

γ) Lues.

Bei den untersuchten Fällen von Lues II mit Erscheinungen und mit positiver WaR. war bei der Versuchsanordnung D. die zur Gerinnung notwendige minimale Blutkonzentration durchschnittlich 1,62 mal niedriger als die des Normalblutes. Winternitz[2]) hat auf refraktometrischem Wege festgestellt, daß die Fibrinogenmenge des luetischen Blutes vermehrt ist. Er hat aus der Prüfung der Refraktionsfähigkeit des Serums und des Hirudinplasmas deren Eiweißgehalt in Prozentzahlen ausgerechnet und angenommen, daß die Differenz dem Fibrinogengehalt entspricht. Er ist zu folgenden Durchschnittsresultaten gekommen:

[1]) G. Petren, Bruns Beitr. z. klin. Chirurg. **120**, 43. 1920.

[2]) A. Winternitz, Arch. f. Dermatol. u. Syphilis, Orig. **101**. 1910.

	Serum %	Plasma %	Fibrinogen
Normal	8,07	8,53	0,46
II. Inkubationsstadium . . .	8,64	9,15	0,50
Lues papulosa	8,92	9,62	0,7

Wenn ich nun 0,7 durch 0,46 dividiere, erhalte ich die Zahl 1,54. Der von Winternitz festgestellte Durchschnittswert der Fibrinogenvermehruug des luetischen Blutes stimmt mit dem oben ausgerechneten Durchschnittswert der Erhöhung der Gerinnungsfähigkeit des luetischen Blutes ziemlich überein. Die Versuchsanordnung D. (auch die Versuchsanordnung B. bei einer Blutverdünnung von 1 : 600) ist geeignet, die Vermehrung des Fibrinogengehaltes des luischen Blutes anzuzeigen.

δ) Schlußfolgerung:

Bekanntlich üben die Temperatur, Adhäsion, Beimischung von Gewebssäften, folglich die Dauer der Blutentnahme, Form, Stoff, Größe des Gefäßes und der Nadel usw. auf die Gerinnungsvorgänge großen Einfluß aus. Doch sprechen die obigen Resultate dafür, daß bei genauer, gleicher Einstellung dieser störenden äußeren Faktoren die obigen Versuchsanordnungen als Methoden zwecks Bestimmung der Gerinnungsfähigkeit des Blutes dienen könnten. Diesbezüglich kommen folgende Verbesserungsmöglichkeiten der Methodik in Betracht: Das Konstruieren einer Verdünnungsspritze, mittels welcher das Blut sogleich bei der Entnahme in der entsprechenden Weise verdünnt werden könnte. Weiters das Ablaufenlassen der Reaktion im Thermostaten.

Eine solche Methode wäre exakter als die zeitbestimmenden Methoden, die bekanntlich nur über die Geschwindigkeit des Gerinnungsvorganges berichten. Außerdem könnte man dadurch die Veränderungen der einzelnen Gerinnungsfaktoren anzeigen. So glaube ich, aus dem Bisherigen annehmen zu können, daß die Versuchsanordnung D. die Veränderungen des Fibrinogenfaktors die Versuchsanordnung B. (nebst Blutverdünnung 1 : 200) dagegen mehr die Veränderungen des Thrombinfaktors nachzuweisen geeignet wäre.

Über die Analyse einer Volumkurve von Blutkörperchen in hypertonischen Lösungen, welche zugleich die Differenzierung von osmotischen und kolloidchemischen Volumänderungen ermöglicht.

Von

Takeo Takei (Osaka, Japan).

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Groningen.)

(Eingegangen am 13. Juli 1921.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

I. Einleitung.

Die physiko-chemische Beeinflussung der roten Körperchen durch ihre Suspensionsmedien, wie sie in der experimentellen Physiologie, Pharmakologie und Immunitätslehre verwendet werden, ist ein wichtiges Thema, das speziell in der Immunitätslehre nicht immer genügend berücksichtigt wurde. Ist es doch einleuchtend, daß eine pharmakologische oder immunologische Beeinflussung der Körperchen sich immer mit der Wirkung des Suspensionsmediums an sich summieren wird und daß viele dergleichen Agenzien in ihrer Wirkung ganz von der Zusammensetzung dieses Mediums abhängig sind.

Ein paar Beispiele mögen diese Erwägung erläutern.

1. Es ist in der letzten Zeit bekannt geworden, daß das Waschen der Körperchen mit reiner Kochsalzlösung die osmotische Resistenz dieser Körperchen beträchtlich erniedrigt, weil diese Lösung ein verflüssigendes Effekt auf die Oberflächenkolloide hat[1]). In der sog. äquilibrierten Salzlösung mit physiologischer Wasserstoffionenkonzentration und Calciumionenkonzentration[2]) wird aber die Resistenz erheblich erhöht, weil das hämolytische Blutlecithin von der Körperchenoberfläche abgespült wird.

---

[1]) Brinkman und van Dam, diese Zeitschr. **108**, 35. 1920.

[2]) Brinkman, diese Zeitschr. **95**, 101. 1919.

2. Seit den Untersuchungen von H. Buchner, Ferrata, Sachs und Teruuchi, Brand, Hecker usw.[1]) ist es bekannt, daß das Komplement in salzfreier isotonischer Lösung nicht imstande ist, hämolytische Amboceptoren zu aktivieren. Diese Erscheinung der Komplementinaktivierung ist eingehend analysiert worden und hat zu der Spaltung des Komplementes in Mittelstück (Globulinfraktion) und Endstück (Albuminfraktion) geleitet. Guggenheimer[2]) stellte nun fest, daß Körperchen, welche in Rohrzuckerlösung gewaschen wurden, schon mit dem Mittelstück beladen und dadurch persensibilisiert sich zeigten, d. h. durch Endstück allein hämolysierten. Andererseits haben Brinkman und van Dam[3]) gefunden, daß Körperchen in Rohrzuckerlösung ihre Lecithinhülle behalten und diese nicht, wie bei der Auswaschung in Salzlösung, verlieren.

Ein weiteres Beispiel dieses differenten Verhaltens der Körperchen in Salzlösung und in Zuckerlösung findet man bei der Kobragifthämolyse. Bang[4]) zeigte, daß Körperchen in Salzlösung nur durch Kobragift hämolysierten, wenn dieser Lösung Lecithin zugesetzt wurde. In Zuckerlösung hämolysierten die Körperchen auch ohne Lecithinzufügung, offenbar dadurch, daß in Zuckerlösung die Körperchen ihre eigene Lecithinhülle noch besitzen.

3. Als Ursache der von Hamburger[5]) und später auch von anderen beschriebene Tatsache, daß die bikonkaven Blutkörperchen in Salzlösung über Stechapfelform die Kugelform annehmen, fanden Brinkman und van Dam[6]) eine elektrische Umladung der Blutkörperchen, welche von dem mittels Reibung geladenen Objektglase herrührte. Im Serum erleidet das Blutkörperchen von dieser Ladung keinen Einfluß, in der Salzlösung wird aber die isolierende Körperchenhülle ausgespült. Die Substanz, welche dieser adsorbierten Schicht ihre Eigenschaften gibt, ist das Cholesterin, das von dem an der Körperchenoberfläche adsorbierten Lecithin in kolloidaler Lösung gehalten wird.

---

[1]) Landsteiner, Handbuch der Biochemie Bd. II (I), S. 395.

[2]) Guggenheimer, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap. 8, 295. 1911.

[3]) Brinkman und van Dam, l. c.

[4]) Bang, Ergebn. d. Physiol. 8, 463. 1909.

[5]) Hamburger, Osmotischer Druck und Ionenlehre Bd. I, S. 199 bis 200.

[6]) Brinkman und van Dam, diese Zeitschr. **108**, 52. 1920.

4. Schließlich sei noch an die Agglutination der Erythrocyten in Rohrzuckerlösung oder Glucoselösung erinnert. Diese wurde von vielen Untersuchern in hohem Grade gefunden, von anderen Forschern aber gar nicht beobachtet. Die Ursache dieses differenten Verhaltens ist die geringe Konstanz der Wasserstoffionenkonzentration der Anelektrolytlösung. Es wurde von Radsma[1]) nachgewiesen, daß jede Körperchenart bei einer bestimmten [H˙] agglutiniert in Zuckerlösung, und daß der isoelektrische Punkt für jede Körperchenart etwas verschieden ist.

Es ist nun seit den Untersuchungen von Hedin[2]) u. a. und in neuester Zeit von Ege[3]) bekannt geworden, daß das Körperchenvolum in isoosmotischen Lösungen nicht das gleiche zu sein braucht. 2 Theorien sind es, welche in der Erklärung dieses Mediumeinflusses auf das Körperchenvolum um den Vorrang streiten, die osmotische und die kolloidchemische Theorie.

Die klassische osmotische Theorie erfordert die Existenz einer relativ semipermeablen Körperchenmembran und ist also innig zusammengewoben mit den Permeabilitätstheorien, welche doch schließlich alle auf kolloidchemischer Basis stehen müssen. Die rein kolloidchemische Auffassung will die Annahme dieser Membran nicht machen und die Erscheinungen der Volumänderung und Hämolyse direkt auf Quellung und Adsorption beziehen.

Nun ist in letzterer Zeit die Existenz einer speziell differenzierten, durch Oberflächenkondensation entstandenen Körperchenhülle wohl sehr wahrscheinlich geworden, und damit ist die osmotische Theorie noch besser fundiert worden.

Zumal für diejenigen Erscheinungen der Volumänderung, welche in kurzer Zeit sich abspielen, wird die initiale osmotische Druckdifferenz wichtig sein; wenn aber die Körperchen längere Zeit in Versuchsmedien verweilen, wird immer wieder die kolloidchemische Beeinflussung zutage treten, wie das seit Höbers[4]) grundlegenden Experimenten bekannt worden ist. Wenn man also osmotischen und kolloidchemischen Einfluß auf die Körperchen in einem und demselben Augenblick, jeden für sich, bestimmen

[1]) Radsma, Arch. néerland. de physiol. **3**, 365. 1919.
[2]) Hedin, Skandinav. Arch. f. Physiol. **5**, 1. 1895.
[3]) Ege, diese Zeitschr. **115**, 109 u. 175. 1921.
[4]) Höber, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **134**, 311. 1910.

will, so muß die Methode der Körperchenuntersuchung eine große Genauigkeit besitzen [wie das z. B. bei der Analyse der osmotischen Resistenz durch Brinkman und van Dam[1]) der Fall war], oder müssen beide Faktoren in ihrer Wirkungsstärke vergrößert werden.

Diese letzgenannte Bedingung meinten wir erfüllen zu können durch die Untersuchung des Körperchenvolums in stark hypertonischer Lösung. In dieser Weise doch waren osmotische und kolloidchemische Faktoren so sehr intensivisiert, daß ihre Wirkung auf das Körperchenvolum gleichzeitig und fast augenblicklich analysiert werden konnte. Vor allem ist diese momentane Untersuchungsmethode auch wertvoll, weil in dieser Weise die komplizierenden Permeabilitätsänderungen auf den zweiten Platz gedrängt werden. Es ist die initiale Osmose bzw. Elektroendosmose[2]), welche hier primär wichtig ist. Längeres Verweilen in der Versuchslösung, wie das z. B. bei Eges Experimenten der Fall war, macht die Erscheinungen schon viel komplizierter.

II. Das Körperchenvolum in Glucoselösungen und in Salzlösungen.

Längeres Verweilen von Blutkörperchen in reinen Glucoselösungen (z. B. länger als eine Stunde) gibt Anlaß zu tiefgreifenden Änderungen: die Körperchenhülle wird modifiziert und außerordentlich empfindlich für Änderungen der [$H^{\cdot}$][3]), Agglutination und Hämolyse können bald eintreten. Die Ionenpermeabilität ist stark erhöht (siehe unten S. 117). Die normal bestehende Permeabilität der Körperchen für Glucose ist nicht nachzuweisen[4]); untersucht man aber Körperchen in äquilibrierter Salzlösung, in der das Kochsalz durch Glucose substituiert wurde, so ist das Bestehen dieser Permeabilität unzweideutig nachzuweisen[5]).

Die schnellere Untersuchung des Körperchenvolums in Glucoselösung schaltet aber alle diese Komplikationen aus; hier ist nur die initialosmotische Wasserentziehung maßgebend.

Die Methodik war folgende:

Hypertonische Rohrzuckerlösungen sind zur Untersuchung des Körperchenvolums ungeeignet, weil ihr spezifisches Gewicht so hoch wird, daß

[1]) Brinkman und van Dam, diese Zeitschr. **108**, 66. 1920.

[2]) S. Jacques Loeb, Journ. of gen. physiol. **1**, 717. 1919; auch Science **53**, 77. 1921.

[3]) Radsma, l. c.

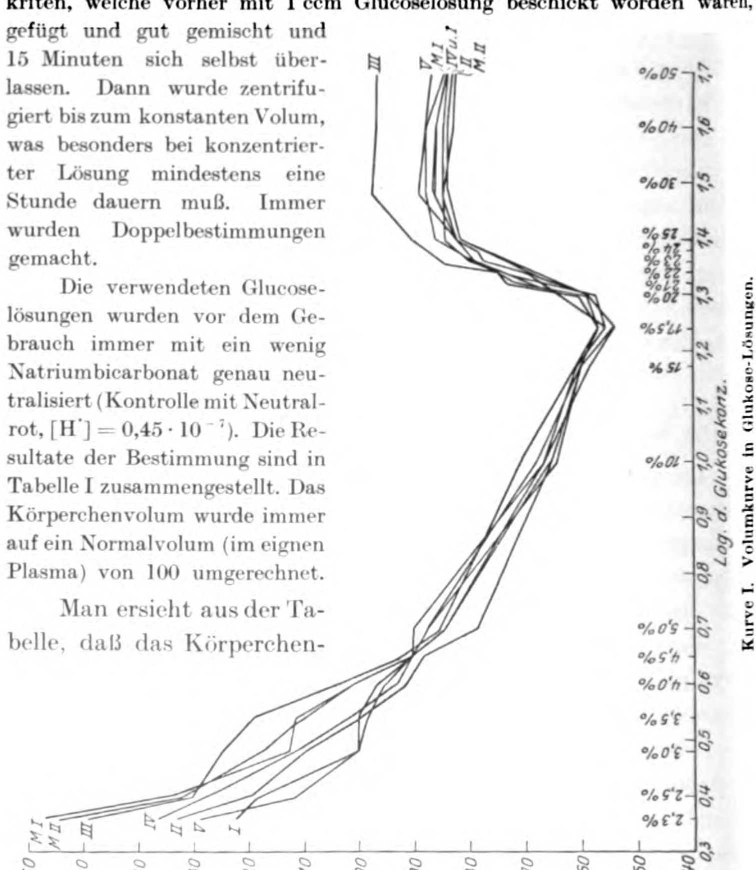
[4]) Ege, l. c.

[5]) Brinkman u. van Dam, Arch. internat. de physiol. **15**, 105. 1919.

die Körperchen nicht mehr gut auszentrifugiert werden können. Wir haben uns deshalb zur Untersuchung des Körperchenvolums in Glucoselösungen beschränken müssen.

Es wurde gearbeitet mit defibriniertem Kaninchen- und Menschenblut; 0,08 ccm frisches Blut wurde in Hamburgerschen Chonohämatokriten, welche vorher mit 1 ccm Glucoselösung beschickt worden waren, gefügt und gut gemischt und 15 Minuten sich selbst überlassen. Dann wurde zentrifugiert bis zum konstanten Volum, was besonders bei konzentrierter Lösung mindestens eine Stunde dauern muß. Immer wurden Doppelbestimmungen gemacht.

Die verwendeten Glucoselösungen wurden vor dem Gebrauch immer mit ein wenig Natriumbicarbonat genau neutralisiert (Kontrolle mit Neutralrot, $[H^{\cdot}] = 0{,}45 \cdot 10^{-7}$). Die Resultate der Bestimmung sind in Tabelle I zusammengestellt. Das Körperchenvolum wurde immer auf ein Normalvolum (im eignen Plasma) von 100 umgerechnet.



Kurve I. Volumkurve in Glukose-Lösungen.

Man ersieht aus der Tabelle, daß das Körperchenvolum in hypotonischen, isotonischen und leicht hypertonischen Lösungen regelmäßig kleiner wird bis zu einer sehr konstanten Glucosekonzentration. Von dieser Konzentration an wird das Körperchenvolum nicht mehr allmählich kleiner, sondern es vergrößert sich plötzlich wieder, so daß in den nächsten hypertonischen Konzentrationen ein Körperchenvolum erreicht wird, das nur sehr wenig kleiner ist als das Volum in istonischer Glucoselösung oder auch als das Normalvolumen der Körperchen.

Tabelle I.

Relatives Körperchenvolumen	Glucoselösungen in Prozenten																	
	2,3	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	10,0	15,0	17,5	20,0	21,0	22,0	23,0	24,0	25,0	30,0	40,0	50,0
Kaninch.-Blutkörperchen I.	132,8	128,7	110,7	109,8	105,8	100,0	97,5	77,9	—	—	69,7	76,2	83,6	89,3	92,6	s. H. 93,4	94,3	94,3	93,4
II.	143,3	130,0	120,0	110,0	106,7	100,0	100,0	76,7	—	—	73,3	75,0	80,0	86,7	88,3	s. H. 91,7	93,3	93,3	92,5
III.	160,0	140,0	135,0	129,3	114,3	102,9	95,7	81,4	—	—	70,0	78,6	82,1	94,3	97,1	s. H. 100,0	107,1	106,4	106,4
Dieselbe n. Wasch.	134,3	126,1	113,0	105,1	94,2	93,5	89,9	68,1	—	—	70,3	76,1	80,4	s. H. 84,1	86,9	91,3	91,3	92,0	90,6
IV.	146,4	137,1	121,4	111,4	103,6	100,7	97,1	74,3	70,0	63,6	68,6	82,9	85,0	88,6	92,1	s. H. 92,9	95,7	95,0	93,6
Dieselbe n. Wasch.	127,9	121,2	120,2	103,8	99,0	96,2	96,2	71,2	65,4	61,5	70,2	s. H. 83,7	87,5	88,5	90,4	92,3	88,5	81,7	80,8
V.	140,0	121,4	110,0	110,0	101,4	98,6	88,6	75,7	70,0	65,7	67,1	81,4	84,3	88,6	91,4	95,7	97,1	97,1	96,4
Dieselbe n. Wasch.	116,2	114,7	114,7	97,1	80,9	80,9	80,1	61,8	55,9	48,5	s. H. 60,3	64,7	70,6	73,5	75,7	78,7	77,2	77,9	76,5
Menschenblutkörperchen I.	167,0	144,3	122,1	121,7	111,3	100,0	94,3	76,4	70,8	65,1	72,6	79,2	84,9	88,6	90,6	91,5	s. H. 98,1	97,2	94,3
II.	164,8	142,6	127,8	120,4	110,2	99,1	94,4	75,0	68,5	63,9	68,5	74,1	77,8	81,5	87,0	s. H. 92,6	94,4	92,6	92,3

S. H = Spur-Hämolyse (Anfangshämolyse in hypertonischen Lösungen).

Diese Erscheinung der plötzlichen Volumvergrößerung der Körperchen sobald ein gewisser Grad der Hypertonie erreicht wird (osmotischer Druck der hypertonischen Lösung 4 mal so groß wie der physiologische osmotische Druck des Plasmas), haben wir immer wieder beobachten können, und stellt ein sehr konstantes Phänomen dar. Die beigefügten Kurven (Kurventafel I) geben ein deutliches Bild dieser Tatsachen.

Um die Ursache dieser plötzlichen Volumzunahme auf die Spur zu kommen, haben wir erstens untersuchen wollen, inwieweit sich diese Erscheinung verallgemeinern läßt, m. a. W. ob sie nicht nur in hypertonischen Glucoselösungen, sondern auch in hypertonischen Salzlösungen gefunden werden kann. Dazu unter-

Tabelle IIa.

Chloridsalzlösungen isosmotisch mit Glucoselösungen in Prozenten.

Nummer der Lösungen	Glucose	NaCl	KCl	RbCl	LiCl 2 aq
I.	4,2	0,9	1,2	1,9	1,2
II.	10,0	2,0	2,6	4,1	2,7
III.	15,0	3,4	—	—	4,6
IV.	17,5	3,8	4,9	7,9	5,1
V.	19,2	4,2	5,4	8,7	5,6
VI.	21,0	4,6	5,9	9,5	6,2
VII.	23,0	5,0	6,4	10,3	6,7
VIII.	25,0	5,4	6,9	11,2	7,3
IX.	30,0	6,5	8,3	13,5	8,7
X.	40,0	8,7	9,4	18,0	11,7
XI.	50,0	10,0	—	—	13,4

Tabelle IIb.

Sulfatsalzlösungen isosmotisch mit NaCl-Lösungen in Prozenten.

Nummer der Lösungen	NaCl	K_2SO_4	Rb_2SO_4	Cs_2SO_4	Li_2SO_4 aq
I.	0,9	2,0	3,0	4,2	1,5
II.	2,0	4,5	6,8	9,3	3,3
III.	3,4	7,6	11,6	15,8	5,6
IV.	3,8	8,5	13,0	17,6	6,2
V.	4,2	9,4	14,4	19,5	6,9
VI.	4,6	10,3	15,7	21,4	7,6
VII.	5,0	11,2	17,1	23,2	8,2
VIII.	5,4	12,0	18,5	25,1	8,9
IX.	6,5	—	22,2	30,2	10,7
X.	8,7	—	29,8	40,4	14,3
XI.	10,0	—	34,2	46,4	16,4

suchten wir das Körperchenvolum in Kochsalzlösungen und, zur Vergleichung des kolloidchemischen Ioneneinflusses, auch in Lösungen der Alkalisulfate. Die Resultate findet man in Tabelle III und IV.

Die verwendeten Konzentrationen der Chloride und Sulfate sind mit Hilfe der isotonischen Koeffizienten aus den Konzentrationen der Glucoselösungen (s. Tabelle I) berechnet worden.

Tabelle II(a und b) gibt eine Übersicht der isoosmotischen Glucose- und Salzlösungen; Tabelle III gibt das Volum in Chloridlösungen, Tabelle IV das Volum in Sulfatlösungen.

Tabelle III.

Relatives Körperchenvolumen in Chloridsalzlösungen.

S. H. = Spur-Hämolyse, d. H. = deutliche Hämolyse.

Nummer der Lösungen[1])	NaCl	KCl	RbCl	LiCl 2 aq
I.	101,2	100,0	97,0	97,8
II.	74,4	72,2	78,4	77,7
III.	68,4	—	—	—
IV.	65,1	60,6	64,9	67,4
V.	61,4	60,6	63,4	67,4 S.H.
VI.	68,4 S.H.	83,8 S.H.	74,6 S.H.	78,3 d.H.
VII.	72,3 „	86,9 „	80,6 „	82,1 „
VIII.	94,0 „	86,9 „	81,3 „	87,5 „
IX.	100,0 d.H.	87,6 „	88,8 „	78,3 „
X.	89,2 „	88,9 „	82,8 „	d.H.
XI.	89,2 „	d.H.	82,8 „	„

Tabelle IV.

Relatives Körperchenvolumen in Sulfatsalzlösungen.

Nummer der Lösungen	K_2SO_4	Rb_2SO_4	Cs_2SO_4	Li_2SO_4 aq
I.	99,5	100,0	96,5	97,7
II.	67,9	70,8	67,4	86,0
III.	67,9	70,8	66,3	69,8
IV.	67,4	69,7	65,1	69,8
V.	67,4	69,7	69,8	65,0
VI.	76,6	75,8	88,4	77,3
VII.	77,7	83,7	—	82,0
VIII.	90,8	89,3	—	85,5
IX.	—	97,8	—	83,7
X.	—	—	—	81,4

Keine Hämolyse.

[1]) Die Zusammensetzungen der Lösungen I—XI sind in Tabellen IIa und IIb wiedergegeben worden.

Fassen wir nun die bisher erreichten Ergebnisse zusammen, so ergibt sich qualitativ und auch quantitativ eine weitgehende Übereinstimmung in dem Einflusse auf das Körperchenvolum der Glucoselösungen, Alkalichlorid- und Alkalisulfatlösungen.

Betrachtet man die Kurven der Volumina in Glucoselösungen (Kurve I), so sieht man, daß von der isotonischen Lösung an das Körperchenvolum ziemlich genau proportional der Glucosekonzentrationszunahme abnimmt, bis in der Konzentration von 18—20% Glucose das Minimalvolumen erreicht wird. In diesem Konzentrationsgebiete ist allem Anschein nach das Körperchenvolum ausschließlich von osmotischen Druckdifferenzen beherrscht.

Nimmt aber die Glucosekonzentration des Suspensionsmediums über 18% Glucose allmählich zu, so erfolgt keine weitere Volumabnahme, sondern fängt das Volumen sehr bald an, schnell und beträchtlich zuzunehmen, bis ein Volum erreicht ist, das nur wenig kleiner ist als das Normalvolumen; in Lösungen, welche über 25% Glucose enthalten, tritt eine immer stärker werdende Hämolyse ein.

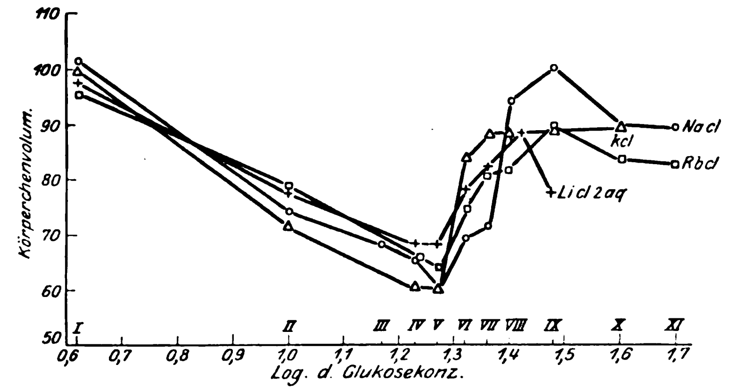
Menschen- und Kaninchenblutkörperchen benehmen sich in dieser Hinsicht in genau gleicher Weise.

Dieselben Erscheinungen wurden nun auch in Lösungen von Alkalichloriden, welche alle mit den verwendeten Glucoselösungen isoosmotisch waren, beobachtet.

Auch hier findet man in dem Gebiete von Isotonie (also ungefähr 0,9% NaCl, 1,2% KCl, 1,9% RbCl, 1,2% LiCl · 2 aq) zu einem sehr bestimmten Grade von Hypertonie eine Volumabnahme, welche ganz gut der osmotischen Drucksteigerung entspricht. Bei einer hypertonischen Konzentration aber von 4,2% NaCl, oder auch von 5,4% KCl, 8,7% RbCl oder 5,6% LiCl · 2 aq wird das Minimalvolumen erreicht, und bei etwas höheren Konzentrationen erfolgt wieder dieselbe plötzliche Volumzunahme bis zu einem Volum, das dem Normalvolumen nur wenig unterliegt. Hier tritt auch schon leichte Hämolyse ein, die bei höheren Salzkonzentrationen immer stärker wird. Eine Übersicht von diesen Erscheinungen gibt auch Kurve II.

Zur Vergleichung haben wir nun auch die Volumbestimmung in Lösungen von Alkalisulfaten ausgeführt.

Die gewählten Konzentrationen waren nicht direkt äquivalent mit den verwendeten Alkalichloridkonzentrationen, sondern



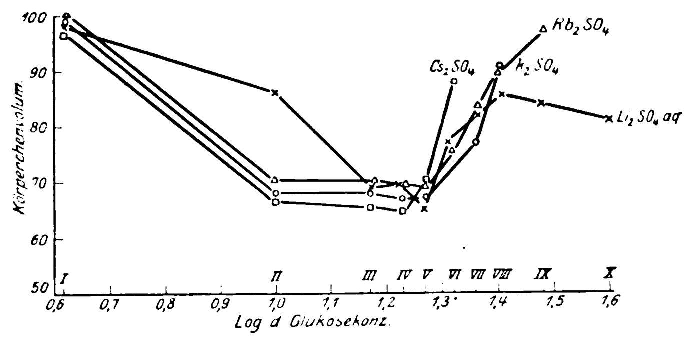
Kurve II. Volumkurven in Alkalichloridlösungen. (Vgl. Tab. IIa u. III.)

wurden berechnet unter Berücksichtigung der isotonischen Koeffizienten nach de Vries, ganz wie es auch in den klassischen Versuchen Hamburgers über Anfangshämolyse in hypotonischen Lösungen geschah, z. B.:

$$NaCl\ 0{,}9\% = \frac{174{,}4 \cdot {}^{3}/_{4} \cdot 0{,}9}{58{,}5} = +\ 2\%\ K_2SO_4\ .$$

Es zeigten sich auch hier wieder genau dieselben Volumänderungen in hypertonischen Lösungen, wie sie auch in Lösungen von Glucose und Alkalichloriden gefunden wurden.

(Das $Na_2SO_4 \cdot 10\,aq$ war wegen seiner relativ geringen Löslichkeit zu diesen Untersuchungen ungeeignet.)



Kurve III. Volumkurven in Alkalisulfatlösungen. (Vgl. Tab. IIb u. IV.)

Vergleicht man nun die Gefrierpunktserniedrigungen derjenigen Lösungen, in welchen das Minimalvolumen erreicht wurde,

so fanden wir in

Glucose 18% . . . . . . $\Delta = -1{,}970$
KCl 5% . . . . $\Delta = -2{,}093$
K_2SO_4 9,5% . . . . . . $\Delta = -2{,}120$

Es zeigte sich also eine ganz gute Übereinstimmung im osmotischen Druck dieser Lösungen von Substanzen, welche doch in kolloidchemischer Hinsicht ganz verschiedene Einflüsse haben sollten.

Wir können also schon aus diesem Befund nach Hamburgers Vorgehen mit großer Wahrscheinlichkeit schließen, daß die initiale Volumabnahme der Körperchen in hypertonischen Lösungen, welche man in Lösungen findet, deren osmotischer Druck bis auf das 4fache des osmotischen Serumdruckes gesteigert wird, fast ausschließlich auf direkt osmotischer Wasserentziehung beruht und nicht durch kolloidchemische Vorgänge beherrscht wird.

Man würde gegen die obengenannten Versuchsreihen, welche auf die primäre Bedeutung der osmotischen Wasserentziehung hinweisen, noch den Einwand erheben können, daß die Körperchenuntersuchung immer in Lösungen geschah, welche kein physiologisch äquilibriertes Ionensystem enthielten. Ist es doch aus zahlreichen Untersuchungen bekannt geworden, daß für die Erhaltung der normalen Dispersität (Viscosität, Oberflächenspannung, Quellungsgrad) der Körperchenkolloide die Anwesenheit eines genau äquilibrierten Ionensystems durchaus notwendig ist.

Wir untersuchten deshalb die Körperchen in einer Lösung folgender Zusammensetzung: NaCl 0,7%, $NaHCO_3$ 0,2%, KCl 0,02%, $CaCl_2 \cdot 6\,aq$ 0,02%, $[H^{\cdot}] = 0{,}45 \cdot 10^{-7}$.

Diese equilibrierte Salzlösung ist fast isotonisch mit einer 4 proz. Glucoselösung, sodaß, wenn zur Erzielung der erforderten Hypertonie Glucose zu dieser Lösung zugesetzt wird, eine solche Salzlösung + z. B. 6% Glucose isoosmotisch ist mit einer 10 proz. Glucoselösung.

Es wurden nun equilibrierte Salzlösungen mit immer größer werdenden Mengen Glucoselösung versetzt und dann in der bekannten Weise darin das Körperchenvolum bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle V zusammengefaßt.

Auch aus dieser Tabelle ersieht man wieder, daß das Minimalvolumen erreicht wird in einer Lösung, welche mit einer 18- bis

Tabelle V.

Nummer der Lösungen	Glucose in 100 ccm Ringerlösung	Relatives Körperchen-volumen
I.	6 g	82,4
II.	11 „	69,4
III.	13 „	67,6
IV.	16 „	78,8
V.	18 „	82,9
VI.	19 „	83,5
VII.	20 „	85,3
VIII.	21 „	87,4
IX.	26 „	87,4 S. H.
X.	36 „	87,4 S. H.

S. H. = Spur-Hämolyse.

20 proz. Glucoselösung isoosmotisch ist. In stärker konzentrierten Lösungen findet man wieder genau dieselbe Volumzunahme, welche in den vorigen Lösungen beschrieben wurde.

Noch mehr einwandfrei sind Versuche, in denen die Körperchen in ihrem eigenen Serum untersucht wurden, denn hier ist nicht nur die Ionenbalancierung, sondern auch die kolloidchemische Balancierung physiologisch. Deshalb untersuchten wir Körperchen in Serum, worin Hypertonie erzielt wurde, durch Zufügung von kleinen Mengen einer stark konzentrierten Glucoselösung; es kamen 0,08 ccm Blut auf 1 ccm hypertonischer Glucose-Serumlösung. In diesen Versuchen wurde mit defibriniertem Rinderblut gearbeitet. Die Resultate ersieht man aus Tabelle VI.

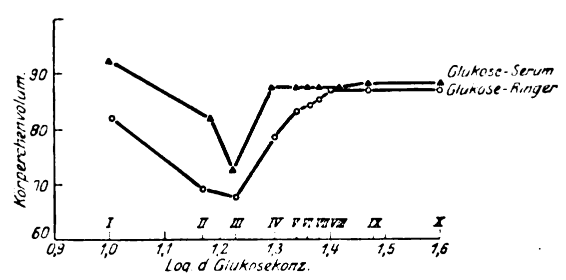
Tabelle VI.

Nummer der Lösungen	Glucose in 100 ccm Serum	Relatives Körperchen-volumen
I.	6 g	91,7
II.	11 „	82,7
III.	13 „	72,6
IV.	16 „	86,9
V.	18 „	86,9
VI.	19 „	86,9
VII.	20 „	87,5
VIII.	21 „	87,5
IX.	26 „	88,1
X.	36 „	88,1

Die Ergebnisse stimmen wieder weitgehend überein mit den schon mitgeteilten Versuchen; das Minimalvolum wird wieder

in derjenigen Lösung gefunden, welche isoosmotisch ist mit einer 18—20 proz. Glucoselösung.

Es ist aber noch darauf aufmerksam zu machen, daß in stärker konzentrierten Lösungen die Volumzunahme nicht so beträchtlich ist wie es in den kolloidfreien Lösungen beobachtet wurde. Weiter bleibt auch das Volum in stärker konzentrierten Lösungen fast konstant und ist auch keine Hämolyse zu verspüren, wie es in stark konzentrierten Zucker- und Salzlösungen wohl immer der Fall war. Auf die Bedeutung dieser letzten Tatsachen müssen wir später zurückkommen (S. 122).



Kurve IV. Volumkurven in Glukose-Ringer und in Glukose-Serum. (Vgl. Tab. V u. VI.)

Wenn man, wie es oben auch für Salz- und Zuckerlösungen gemacht wurde, nun wieder den Gefrierpunkt derjenigen äquilibrierten Salzlösung oder des hypertonischen Serums bestimmt, in denen das Minimalvolum auftrat, so finden wir wieder:

Eq. Salzlösung + 14% Glucose . . $\Delta = -2{,}005$
Serum + 14% Glucose . . . . . . $\Delta = -2{,}075$

Aus diesen Untersuchungen können wir also mit Sicherheit schließen, daß für die Wasserentziehung der Körperchen in hypertonischen Medien, bis zu einer auf das 4 fache der normalen Isotonie gesteigerten Hypertonie nur der osmotische Druck der Versuchslösung maßgebend ist, und daß etwaige kolloidchemische Einflüsse bei diesen initialen Prozessen völlig auszuschließen sind.

III. Die Ursache der Volumzunahme von Blutkörperchen in Suspensionsflüssigkeiten mit auf das Vierfache der normalen Isotonie gesteigertem osmotischen Druck.

In den oben beschriebenen Versuchen wurde festgestellt, daß die plötzliche Volumzunahme der Körperchen immer bei einem und demselben osmotischen Druck der Lösung stattfindet, welcher Art auch die gelöste Substanz sein möge. Die Volum-

zunahme der Körperchen geschieht also, wenn dem Körperchen eine bestimmte Menge Wasser entzogen worden ist. Zur Erklärung dieser interessanten Tatsache könnten wir die folgende Hypothese aufstellen.

Die große Konstanz der Abhängigkeit von Körperchenvolumzunahme und maximaler Wasserentziehung weist auf die Bedeutung des Körpercheninhaltes hin, denn die Konzentrierung dieses Inhaltes ist das einzige, was die Körperchen in den verschiedenen hypertonischen Lösungen gemeinsam haben. Man könnte nun folgende 2 Voraussetzungen machen: Erstens wäre es möglich, daß durch die erhebliche Konzentrierung des Körpercheninhaltes, speziell der Innensalze, eine plötzliche absolute Permeabilität der Körperchenmembran eintrat. Osmotische Druckdifferenzen könnten dann nicht mehr bestehen und das Körperchenvolum würde sich in den stark hypertonischen Lösungen nicht weiter verkleinern. Diese Annahme könnte wohl erklären, daß das Körperchenvolum nicht mehr kleiner wurde, aber nicht, daß es sich wieder erheblich vergrößert, wie das doch tatsächlich der Fall ist.

Zweitens könnte man sich vorstellen, daß durch die stärkere Konzentrierung der Innensalze die Viscosität des Körpercheninhalts oder dessen Quellungsdruck ziemlich schnell so groß wurde, daß eine Volumzunahme entgegen dem osmotischen Druckgefälle resultierte, daß also die Volumzunahme verursacht wurde durch eine Steigerung des kolloidchemisch gebundenen Körperchenwassers.

.Um zwischen diesen beiden Auffassungen unterscheiden zu können, haben wir erst die Ionenpermeabilität der Körperchen in konzentrierteren Zuckerlösungen untersucht. Wir könnten das leicht machen durch die Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit von Körperchensuspensionen in konzentrierten Zuckerlösungen. Das Resultat ist in Tabelle VII zu ersehen.

Tabelle VII.

Relatives Körperchenvolumen	131.2	116,7	100,0	83,3	57,8	56,3	55,7	59,4	64,6	87,5
Glucoselösungen in %	2,5	3,0	4,0	7,0	10,0	15,0	17,0	20,0	22.0	25,0
Elektrisches Leitvermögen (in $10^{-5}\,\Omega$)	3,439	3,289	3,309	4,987	6,343	7.709	8,742	9,435	11,177	14.712

Die Methodik war folgende: Frisches defibriniertes Kaninchenblut wurde mit 4,2 proz. Glucoselösung schnell 3 mal ausgewaschen,

bis die Chlorreaktion ganz verschwunden war. Die Körperchenkonzentration wurde dann wieder der ursprünglichen Normalkonzentration gleichgemacht. Von diesem Gemische wurden je 0,5 ccm zu 5 ccm der Glucoselösungen zugefügt und dann die Leitfähigkeit dieser Suspensionen in Gefäße nach Hamburger bestimmt.

Nach halbstündigem Verweilen hatte sich die Leitfähigkeit dieser Glucosesuspensionen nur wenig geändert; wenn die Körperchen aber $1^1/_2$ Stunde in den Lösungen verweilt hatten, zeigte sich eine bedeutende Zunahme der Leitfähigkeit, welche aber nicht plötzlich bei der bekannten Konzentration von 18—20% Glucose sich zeigte, sondern allmählich und proportional der steigenden Glucosekonzentration auftrat[1]).

Das Auftreten dieser Ionenpermeabilität könnte also die beobachtete Volumzunahme nicht erklären, da sie nicht plötzlich auftrat, sondern proportional der Glucosekonzentration, und weil sie sich erst nach $1^1/_2$stündiger Einwirkung zeigte.

Wir hatten dann also weiter zu untersuchen, inwieweit sich das Wasserbindungsvermögen der Körperchenkolloide unter dem Einfluß einer Konzentrierung der Körpercheninnensalze ändern konnte. Zur Messung des Quellungsvermögens der Körperchenkolloide benutzten wir ihre Viscosität.

Direkte Untersuchungen über Viscosität der Körperchenkolloide sind uns nicht bekannt, wohl aber bestehen zahlreiche Untersuchungen von Koch[2]), Höber[3]), Handovsky[4]) u. A.[5]), welche den großen Einfluß von Ionen und Ionenkombinationssystemen auf die Viscosität einer der wichtigsten Bestandteile des Hämochroms [Bohr[6])], nämlich auf das Lecithin, darstellen.

Zur Darstellung des kolloiden Körpercheninhaltes benutzten wir die Methode Offringas[7]):

---

[1]) Bang zeigte schon früher, daß die osmotische Resistenz der Körperchen in 8proz. Rohrzuckerlösung größer wird, je länger die Körperchen in der Lösung verweilen, durch die eintretende Ionenpermeabilität.

[2]) Koch und Mitarbeiter, S. Forbes und Keith, Phosphorus Compounds in Animal Metabolism, Ohio Agricult. Station. Bull. n. **5**. **1914**.

[3]) Höber, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **11**, 35. 1907.

[4]) Handovsky, diese Zeitschr. **31**. 32. 1907.

[5]) S. Forbes und Keith, l. c. — Neuschlosz, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **18**, 17, 40. 1920.

[6]) Bohr, Handbuch der Physiol. Bd. I.

[7]) Offringa, diese Zeitschr. **28**, 112. 1910.

Das Blut wird 3 mal mit äquilibrierter Salzlösung gewaschen und dann die scharf abzentrifugierten Körperchen mit gereinigter Infusorienerde innig gemischt. Die Paste wird in gereinigte Watte eingehüllt und in der Buchnerschen Presse unter 300 Atmosphären ausgepreßt. Der Preßsaft wird durch Zentrifugieren ganz von Körperchen befreit. Die Viscosität dieser Körperchenkolloide wird mittelst dem Viscostalagnometer nach Traube gemessen bei genau konstanter Temperatur.

Die Abhängigkeit der Viscosität des Körperchenpreßsaftes von der Konzentration der Innensalze läßt sich sehr deutlich durch Dialyse dieses Preßsaftes erweisen.

Körperchenpreßsaft wurde in einer Extraktionshülse, die mit Kollodium imprägniert worden war, gegen destilliertes Wasser dialysiert.

Die Ausflußzeit des Viscostalagnometers war für Wasser 2 Min. 20 Sek.

Ausflußzeit für undialysierten Preßsaft			. . .	17 Min.	2 Sek.
„ nach	20 Minuten	Dialyse	. . .	14 „	49,2 „
„ „	40 „	„	. . .	15 „	20 „
„ „	60 „	„	. . .	12 „	47 „
„ „	3,5stündiger	„	. . .	8 „	16 „
„ „	4,5 „	„	. . .	8 „	10 „
„ „	6,5 „	„	. . .	7 „	58 „
„ „	24 „	„	. . .	5 „	32 „

Etwaige Trübung oder Fällung war nicht eingetreten.

Damit wir nun auch den Einfluß der Innensalzkonzentrierung auf die Viscosität des Preßsaftes untersuchen konnten, verfuhren wir in folgender Weise:

Blutkörperchen des Kaninchens wurden einmal schnell in 4,2 proz. Glucoselösung gewaschen und dann in gleichen Konzentrationen suspendiert in Lösungen von 4,2% Glucose, 15% Glucose, 18% Glucose und 21% Glucose. Die Körperchen wurden in diesen Lösungen während 10 Minuten sich selbst überlassen, dann abzentrifugiert und in der oben angegebenen Weise ausgepreßt. Es zeigte sich nun, daß man von den Körperchen aus 18 proz. Glucose und 21 proz. Glucose ungleich weniger Preßsaft bekommen konnte als von Körperchen aus isotonischer Lösung, eine Erscheinung, die schon auf die vergrößerte Wasserbindung durch Körperchenkolloide hinweist. Damit wir nun die Viscosität

der Preßsäfte von Körperchen aus den oben angegebenen hypertonischen Medien untereinander vergleichen konnten, war es nötig, daß die Kolloidkonzentration aller Preßsäfte die gleiche war. Deshalb fügten wir zu den stärkeren Konzentrationen soviel der entsprechenden Glucoselösungen, bis die Farbeintensität aller Preßsäfte die gleiche der Farbe des Preßsaftes der Körperchen aus 21 proz. Glucoselösung war.

Die Viscositätsbestimmung zeigte dann folgendes:

		Min.	Sek.
1.	Ausflußzeit v. Körperchenpreßsaft a. 4,2 proz. Glucoselös.	2	58,3
2.	„ „ „ „ 15 „ „	3	
3.	„ „ „ „ 18 „ „	4	17,6
4.	„ „ „ „ 21 „ „	4	23,6

Es war also durch die Konzentrierung der Innensalze in Lösungen über 18% Glucose eine erhebliche Zunahme der Viscosität entstanden: Die Auslaufszeit war bedeutend größer wie die normale.

Zusammenfassend können wir also schließen, daß die Volumzunahme, welche man in Lösungen beobachtet, deren Hypertonie das 4fache der normalen Isotonie überschreitet, durch Quellung der Blutkörperchen entsteht. Ein intensiverer Quellungsprozeß leitet dann schließlich zur Hämolyse.

Als Analogon dieser Körperchenquellung in stark hypertonischen Medien erinnere man sich an das klassische Beispiel Ludwigs: Eine gut getrocknete Schweinsblase, welche in sehr konzentrierter NaCl-Lösung eingetaucht wird, quillt unter Aufnahme einer verdünnten Salzlösung, während Kochsalz auskrystallisiert.

Auch hier beim Blutkörperchen in einer Lösung mit genügender Hypertonie wird der Quellungsdruck des Körperchens so hoch, daß die osmotische Druckdifferenz direkt überwunden wird.

IV. Über die Reversibilität der Körperchenquellung in stark hypertonischen Lösungen und über die Hämolyse.

Indem wir nun feststellten, daß die Volumzunahme von Körperchen in hypertonischen Lösungen auf die Quellung des Körpercheninhaltes beruht, wollten wir weiter versuchen, durch Verringerung der hypertonischen Mediumkonzentration wieder Entquellung zu erreichen. Die Verhältnisse werden hier aber sehr kompliziert, weil der quellende Körpercheninhalt ein sehr kom-

plexes Kolloid darstellt. Betrachten wir nur das Bohrsche Hämochrom, also eine kolloide Hämoglobin-Lecithinverbindung, so sieht man in allen Versuchen, wo die Quellung etwas stärker wurde, Hämolyse auftreten, also Spaltung des Hämochroms. Dadurch wird die Quellung nicht mehr meßbar.

Bechhold sagt in seinem bekannten Buche[1]) folgendes über die Hämolyse in konzentrierter Neutralsalzlösung: „Solche Salzlösungen, welche das Stroma entquellen ohne Hämoglobin zu koagulieren, werden Blutkörperchen hämolysieren. In der Tat bewirkt konzentrierte Neutralsalzlösung Hämolyse. Die Blutfarbstoffemulsion wird ausgepreßt . . .“

Diese Auffassung ist aber sicher nicht richtig, denn wie wir oben beschrieben, geht der Hämolyse immer eine beträchtliche Quellung voran und ist von einer Auspressung durch Schrumpfung nicht die Rede. Auch mikroskopisch läßt sich diese initiale Quellung sehr leicht feststellen.

Vielmehr wird der Vorgang mit der von M. H. Fischer[2]) beschriebenen Quellung des Carminfibrins übereinstimmen; auch hier wurde das adsorbierte Carmin durch Quellung in Neutralsalzlösung wieder frei.

Es war nun für uns die Frage, ob wir die gequollenen Körperchenkolloide durch vorsichtige Verringerung des osmotischen Außendruckes wieder entquellen konnten. Es zeigte sich, daß innerhalb des „osmotischen Gebietes“ der Volumzunahme eine Reversion der Volumänderung sich gut herstellen ließ; daß aber, sobald Quellungsvorgänge die Volumzunahme beherrschten, ein Versuch zur Entquellung durch Wasservermehrung des Körpercheninhalts unmittelbar Hämolyse herbeiführte.

Bringt man nämlich gewaschene Körperchen von 5 proz. Glucoselösung in 10 proz. Glucoselösung, so erfolgt eine Volumabnahme von 66 auf 50 Hämatokritstriche. Saugt man dann die 10 proz. Glucoselösung ab und gießt wieder 5 proz. Glucoselösung auf, so bekommen die Körperchen wieder ein Volum von 66 und es tritt keine Hämolyse ein. Macht man aber dasselbe in Lösungen von 17- und 20 proz. Glucose, so erfolgt beim Mediumaustausch unmittelbar starke Hämolyse. Man konnte sich folgende Erklärung denken: Körperchen in 21 proz. Glucoselösung enthalten

[1]) Bechhold, Kolloide in Biologie und Medizin. 2. Aufl., S. 332.

[2]) M. H. Fischer, Das Ödem. Dresden 1911.

nur eine sehr kleine Menge freies Wasser. Und eine minimale Zunahme der Quellung auf Kosten des freien Körperchenwassers wird die Konzentration der freigelösten Innensalze so sehr erhöhen, daß unmittelbar Mediumwasser angezogen wird zum Konzentrationsausgleich. Das Quellungswasser muß also indirekt vom Medium geliefert werden und Gleichgewicht wird erreicht, wenn Quellungsdruck der Körperchenkolloide und osmotischer Druck des Mediums einander aufheben. Wird der osmotische Druck des Mediums nun plötzlich verringert, so wird die Quellung zunehmen, bis schließlich Hämolyse eintritt.

Wenn aber auch im Suspensionsmedium das Wasser nicht mehr frei, sondern in kolloidaler Bindung anwesend ist, wird sich zu der osmotischen Wasseranziehung des Mediums noch der Quellungsdruck des Mediums fügen. Das ist eben der Fall, wenn Körperchen in mittelst Glucosekonzentrationen hypertonisch gemachtem Serum untersucht werden. Wir haben oben (S. 115) schon vermeldet, daß Körperchen, welche in hypertonisches Glucoseserum in kleinen Konzentrationen suspendiert werden, nur wenig und nur bis zu einem bestimmten Volum quellen. Viel deutlicher wird diese Erscheinung noch, wenn man die Glucosemengen direkt zu dem Plasma zusetzt und die Körperchen in ursprünglicher Blutkonzentration untersucht, weil dann die relative Menge freies Wasser sehr viel kleiner wird. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über das Verhalten der Körperchen in Blut, das mit Glucose hypertonisch gemacht wurde.

Tabelle VIII.

Zum Serum gesetzte Glucose in Prozenten	Relatives Körperchenvolumen
15	74,0
16	71,0
17	71,0
18	70,5
19	69,5
20	69,0
21	68,7
22	68,4
23	68,0
24	68,0
25	67,8
30	67,2

Die Methodik war folgende:

Je 1 ccm defibriniertes Kaninchenblut wird $^1/_2$ Stunde scharf zentrifugiert; das überstehende Serum wird vorsichtig gemessen und abgesaugt. In diesem Serum löst man die berechnete Menge Glucose, fügt es dann wieder zu den Körperchen und rührt schnell auf.

Fügt man die feste Glucose zum Blute, so entsteht immer starke Hämolyse; wird die Glucose aber im Serum gelöst, so unterbleibt die Hämolyse. Man ersieht aus der Tabelle, daß jetzt die beschriebene Quellung gar nicht auftritt, offenbar weil nur sehr wenig freies Wasser im Medium anwesend ist.

Ob nun die Wasserentziehung zu einer Desäquilibrierung der normalen Körperchenionenkonzentration und dadurch zur Quellung leitet, oder daß eine Änderung des $[H^{\cdot}]$ des Körpercheninnern als Ursache angegeben werden muß, darüber können wir jetzt noch wenig aussagen. Wir versuchten mittelst Kataphorese mit mikroskopischer Beobachtung eine Ladungsänderung eventuell eine Umladung der Körperchen in stark konzentrierten Glucoselösungen nachzuweisen, aber die Ladung der Körperchen erschien in allen Lösungen in gleicher Stärke negativ.

Eine Ionendesequilibrierung durch Wasserentziehung könnte man sich in folgender Weise vorstellen: Die roten Körperchen enthalten normalerweise eine physiologische Calciumionenkonzentration[1]), deren Größe von der Beziehung $[Ca^{\cdot\cdot}] = K \cdot \frac{[H^{\cdot}]}{[HCO'_3]}$ gegeben ist. Nun konnten wir bei Körperchen in stark konzentrierter Zuckerlösung keine Änderung des $[H^{\cdot}]$ feststellen, aber die Bicarbonationenkonzentration muß sich erheblich vergrößert haben, und daraus resultiert eine proportionelle Verringerung des $[Ca^{\cdot\cdot}]$. Nun ist gerade diese $[Ca^{\cdot\cdot}]$ die wichtigste Ionenkonzentration, welche die lyotrope, quellungsfördernde Wirkung der Körperchenkaliumionen balancieren muß. Wenn wir z. B. zur Vergleichung die Quellungsverhältnisse beim Muskel anziehen, welche ja dort viel besser bekannt sind als bei den Erythrocyten, so sehen wir, daß für die Erhaltung der normalen Muskelquellung das Verhältnis K : Ca von ausschlaggebender Bedeutung ist. Im geöffneten Muskelfaser (wo also die osmotische Wasseranziehung ausgeschlossen ist), verursachen Kalisalze starke Quellung, aber sehr geringe Ca-Mengen genügen, um eine Entquellung von

[1]) Hamburger, Zeitschr. f. physikal. Chem. **69**, 663. 1909. — Brinkman, diese Zeitschr. **95**, 101. 1919.

über 30% zu bewirken[1]). Wenn also durch Wasserentziehung die [Ca¨] des Körpercheninhaltes bis zu einem bestimmten Grade verringert ist, wird das Überwiegen der Kaliumionen von Quellung der Körperchen erfolgt sein.

V. Über die mögliche klinische Bedeutung der Volumkurve.

Schließlich wollen wir noch einige Bemerkungen machen über den eventuellen Gebrauch der beschriebenen Volumkurve für die klinische Körperchenuntersuchung.

Weil doch die Volumkurve des normalen Blutes einen ganz konstanten typischen Verlauf hat und bei Benutzung gut kalibrierter Hämatokriten mit fast mathematischer Genauigkeit leicht zu konstruieren ist, so können auch kleinere Abweichungen des normalen Verlaufes gut verwertet werden. Die Volumkurve könnte dann sozusagen eine Fortsetzung der osmotischen Resistenzkurve bilden. Die Bedeutung der Volumkurve ist insoweit der der Resistenzkurve überlegen, daß bei der osmotischen Hämolyse immer auf der durch osmotische Kräfte bedingten Wasseranziehung die kolloidchemische Hämochromolyse folgt, und daß zwischen osmotischen und kolloidchemischen Prozessen nicht genügend zu differenzieren ist. Bei der Volumkurve aber sind der osmotische und kolloidchemische Teil der Kurve, oder Wasserentziehung und Quellung, gut voneinander zu trennen. Gerade der Quellungsteil der Volumkurve möchte für die klinische Untersuchung wichtig sein. Ist es doch eine erste Aufgabe dergleichen Kurven, uns über das physiologische Alter der Körperchenkolloide zu orientieren, und ist es doch die Quellungsfähigkeit dieser Kolloide, die in physiko-chemischer Hinsicht einer der besten Indikatoren ist.

Folgender Versuch ist ein vorläufiger Bericht über die Formänderung der Kurve durch Blutungsanämie mit Körperchenregeneration.

Einem gut genährten Kaninchen wurden ± 40 ccm Blut aus der Ohrvene entnommen; das Blut wurde steril aufgefangen und aseptisch bewahrt bei Zimmertemperatur.

Die Regeneration beim Kaninchen gestaltete sich folgendermaßen:

---

[1]) Widmark, Skandinav. Arch. f. Physiol. **23**, 421. 1910; **24**, 13, 339. 1911.

	Hämoglobin-gehalt	Körperchen-zahl
Vor der Blutentnahme . .	48	4 140 000
24 Stunden nach Aderlaß	38	3 110 000
48 „ „ „	34	2 720 000
72 „ „ „	32	2 285 000
96 „ „ „	35	2 645 000
120 „ „ „	40	3 540 000
168 „ „ „	47	3 920 000

Es wurde nun die Volumkurve dieser Körperchen in hypertonischen Glucoselösungen bestimmt und zwar vor der Blutentnahme und 24, 48, 96 und 120 Stunden nachher. Zur Vergleichung haben wir daneben Volumkurven des steril in vitro aufbewahrten Blutes untersucht, damit das Altern der Körperchen in vivo und in vitro nebeneinander gestellt werden konnte.

Die Ergebnisse sind in Tabelle IX zusammengestellt (siehe auch Kurve V).

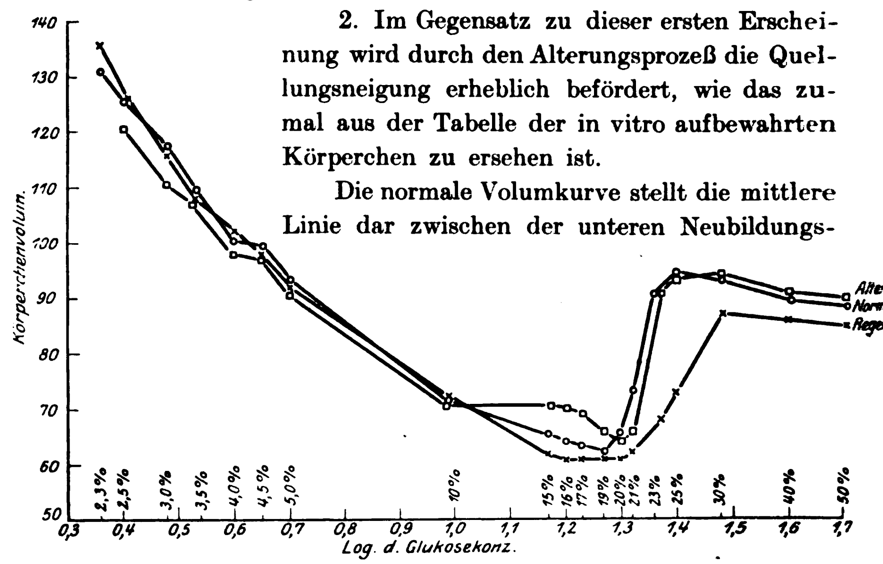
Tabelle IX.

H = Hämolyse. S. H = Spur-Hämolyse. d. H. = deutliche Hämolyse.

Glucoselösungen in %	Körperchenvolumina: vor der Aderlaß-anämie	des frisch entnomm. Blutes – Zeit nach der Anämie in Stunden: 48	120	des aufbewahrten Blutes – Zeit der Aufbewahrung in Stunden: 96	120
2,3	131,5	142,6	136,0	130,4	H
2,5	126,6	127,7	126,0	120,0	120,6
3,0	116,9	117,0	116,0	113,4	111,1
3,5	109,7	111,7	108,0	107,2	107,9
4,0	100,8	103,2	102,0	97,6	98,4
4,5	99,2	100,0	99 0	97,6	97,6
5,0	93,5	93,6	93,0	89,6	90,5
10,0	71,0	77,7	72,0	68,9	71,4
15,0	65,3	69,2	62,0	68,9	70,6
16,0	62,9	67,0	61,0	68 0	69,8
17,0	62,9	66,0	61,0	68,0	69 0
18,0	62,1	64,9	60,0	67,2	64,3
19,0	62,1	66,0	61,0	64,0	65,9
20,0	65,3	66,0	61,0	64,0	64,9 [S. H.]
21,0	73,4	68,1	62,0	67,2 [S. H.]	65,9 [S. H.]
22,0	85,5	76,6	63,0	77,6 [S. H.]	90,5 [S. H.]
23,0	90,3	81,9	68,0	88,9 [S. H.]	91,3 [S. H.]
24,0	92,7	86,2	70,0	91,2 [S. H.]	92,1 [S. H.]
25,0	94,4 [S. H]	87,2 [S. H]	73,0 [S. H]	96,0 [S. H.]	92,9 [S. H.]
30,0	92,7 [S. H]	89,4 [S. H]	87,0 [S. H]	97,6 [S. H.]	93,7 [d. H.]
40,0	88,7 [S. H]	89,4 [S. H]	86,0 [S. H]	96,0 [d. H.]	90,5 [d. H.]
50,0	88,7 [S. H]	87,2 [S. H]	85,0 [S. H]	91,2 [d. H.]	90,5 [d. H.]

Man bemerkt folgendes:

1. Wenn Regeneration auftritt (nach 96 und 120 Stunden), tritt der Quellungsumschlag später ein, offenbar weil die neugebildeten Körperchen eine stärkere Wasserentziehung ertragen, bevor Quellung eintritt.



2. Im Gegensatz zu dieser ersten Erscheinung wird durch den Alterungsprozeß die Quellungsneigung erheblich befördert, wie das zumal aus der Tabelle der in vitro aufbewahrten Körperchen zu ersehen ist.

Die normale Volumkurve stellt die mittlere Linie dar zwischen der unteren Neubildungs-

Kurve V. Volumkurven: Alterung (120 Stunden) in vitro, normal und (130 Stunden) nach Aderlaß, Regeneration.

kurve und der oberen Alterungskurve. Es ist also umgekehrt die Möglichkeit gegeben, aus der Betrachtung einer willkürlichen Volumkurve auf Regeneration oder Alterungsprozesse zu schließen.

Zusammenfassung.

1. Blutkörperchen des Menschen-, Kaninchen- oder Rinderblutes, welche in hypertonische Medien gebracht werden, schrumpfen proportional des osmotischen Außendruckes, wenn dieser Außendruck nicht das 4fache der normalen Isotonie ($\Delta = \gamma - 2^{c}$) überschreitet.

2. Wird der osmotische Außendruck größer als das 4fache der normalen Isotonie, so erfolgt eine plötzliche Volumzunahme der Körperchen fast bis zum Isotonievolumen.

3. Diese Volumzunahme beruht auf Quellung der Körperchenkolloide, welche Quellung wahrscheinlich von Ionendesäquilibrierung der Körpercheninnensalze verursacht wird.

4. Die osmotische Schrumpfung ist reversibel, die Quellung ist irreversibel, weil bei plötzlichem Zutritt von freiem Wasser immer Hämolyse erfolgt.

5. Die Volumina von Körperchen in hypertonischen Medien lassen sich zu einer Volumkurve zusammenstellen. Die Form dieser Kurve ist konstant und typisch und nicht abhängig von der chemischen Zusammensetzung des Mediums, sondern nur von deren osmotischem Druck. Lösungen von Alkalichloriden oder Alkalisulfaten, Glucoselösung oder Glucose-Ringerlösung, welche isoosmotisch sind, geben eine und dieselbe Volumkurve.

6. In hypertonischem Glucoseserum erfolgt keine Quellung, weil in diesem Medium das Wasser zum größten Teil kolloidchemisch gebunden ist.

7. Der Hämolyse in konzentrierter Neutralsalzlösung geht immer eine erhebliche Quellung voran; von einer Schrumpfungshämolyse nach Bechhold ist also nicht die Rede.

8. Es wurde darauf hingewiesen, daß diese Volumkurve, zumal deren Quellungsteil, eine Bedeutung für die klinische Blutuntersuchung haben kann, weil die älteren Körperchen sich durch vergrößerte, die jungen Körperchen sich durch verminderte Quellungsneigung auszeichnen.

Über den Stickstoffansatz bei Fleisch- und Mehlkost.

Von

L. Dienes.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 18. Juli 1921.)

In den letzten Jahren wurden die Kenntnisse in der auch vom praktischen Standpunkt wichtigen Frage, ob die Eiweißkörper der verschiedenen Nahrungsmittel für die menschliche Ernährung gleichwertig sind, durch die Versuche von Hindhede[1]), Abderhalden, Rose u. a.[2]) erweitert. Die genannten Autoren haben im Gegensatz zu früheren Arbeiten von Rubner[3]) und Thomas[4]) gefunden, daß bei langen Minimumversuchen die Eiweißkörper der Kartoffel und des Brotes bei ungefähr gleichgeringen Werten N-Gleichgewicht ergeben.

Die folgenden Versuche, die ich Herbst 1913 und Frühjahr 1914 durchführte, wollen dasselbe Problem von einer anderen Seite erfassen.

Von der Ansicht ausgehend, daß die Unterschiede im Verhalten der einzelnen Eiweißkörper, wenn solche überhaupt vorhanden sind, am stärksten bei Ansatz größerer Eiweißmengen bemerkbar sein müssen, da bei Minimumversuchen die Möglichkeit vorhanden ist, daß die in der Nahrung eventuell fehlenden Eiweißkörper von den abgebauten Körpersubstanzen ersetzt werden, habe ich den Eiweißansatz nach einem vorhergehenden intensiven Eiweißverlust untersucht, wobei das Eiweiß ausschließlich in einem einzigen Nahrungsmittel gereicht wurde.

---

[1]) Skandinav. Arch. f. Physiol. **28**.

[2]) E. Abderhalden, G. Ewald, A. Fodor und C. Rose, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **160**.

[3]) Volksernährungsfragen Bd. 115. 1908.

[4]) Arch. f. Anat. u. Physiol. 1909, S. 219.

Die Versuchsperson war ein 23jähriger junger Mann (Dr. med.), gesund, von fast athletischem Körperbau. Seit seinen Kinderjahren neigte er zu Fettleibigkeit und in seiner Familie waren mehrere Diabetesfälle zu verzeichnen. Bei einer stark reduzierten Nahrungszufuhr hatte sein Körpergewicht vom 20. VIII. bis 7. X. 1913 (mit Kleidung gewogen) von 104 kg auf 86 kg abgenommen. Die Diät bestand aus 100 g Emmenthaler Käse, 500 ccm Milchkaffee, 700 g Äpfel, 30 g Brot, 500 g Trauben und 0,4 Liter Wein. In den letzten 2 Wochen der Abmagerungskur, in deren Verlauf ich die Ausscheidungen untersucht habe, hatte der betreffende ungefähr 10 g Eiweiß pro Tag verloren. — Das ergibt für 48 Tage 480 g Eiweiß. Wahrscheinlich war aber der Eiweißverlust in den ersten Tagen viel höher und der Gesamtverlust bei weitem mehr als 480 g. Dieser Abmagerungskur folgte sofort die erste Versuchsreihe. Ende November mußten wir wegen Abreise der Versuchsperson die Versuche abbrechen und konnten diese erst im März, wieder mit einer Abmagerungskur beginnend, von neuem aufnehmen.

Der Plan der Untersuchung war folgender: Zuerst wollten wir das Eiweißminimum der Versuchsperson feststellen, damit wir für den Vergleich des aufgenommenen und angesetzten Eiweißes einen Anhaltspunkt erhielten. Dann sollte die Untersuchung des Eiweißansatzes bei niedriger, später bei höherer Eiweißaufnahme folgen. Wir beabsichtigten den Ansatz bei Fleisch-, Erbsen- und Weizenernährung zu vergleichen. Die 2. Versuchsreihe im März sollte zur Wiederholung der auf das Weizenmehl bezüglichen Versuche dienen. — Die einzelnen Perioden hatten wir mit 5—7tägiger Zeitdauer festgesetzt. Der Caloriengehalt der Kost wurde auf Wunsch der Versuchsperson niedrig gehalten, da sie das verlorene Körpergewicht nicht zurückgewinnen wollte. Während der ersten Perioden blieb der Caloriengehalt der Kost wahrscheinlich unter dem Bedarf; vielleicht konnten wir darum keinen Eiweißansatz beobachten (2700—2970 Cal.). In den folgenden Perioden erreichte der Caloriengehalt der Nahrung den Bedarf (3080—3280) oder blieb nur unwesentlich unter diesem. Als Beweis dafür dient die Tatsache, daß sich das Gewicht der Versuchsperson trotz Aufnahme von 600 g Eiweiß, welches etwas über 2 kg Muskel entspricht, nicht veränderte. Wäre ein Fettverlust dem angesetzten Eiweiß entsprechend vor sich gegangen, so hätte dies in der ersten Hälfte der Versuchsreihe einem Verlust von 500 Cal. pro Tag und 250 Cal. in der zweiten Hälfte der Versuchsreihe entsprochen. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß der Verlust so groß gewesen ist, da ja durch den besseren Er-

nährungszustand auch der Wassergehalt des Organismus niedriger sein mußte.

Die Schwankungen des Caloriengehaltes der Kost in den zu vergleichenden Perioden waren gering (ausgenommen Periode 7), so daß eine Vergleichung der Perioden trotz des etwas niedrigeren Caloriengehalts der Nahrung berechtigt ist.

In bezug auf die technische Durchführung der Versuche machen wir folgende Bemerkungen: Die einzelnen Nahrungsmittel wurden im großen eingekauft. Die Kartoffeln und Äpfel waren von einer Sorte, ihr N-Gehalt hatte bei verschiedenen Bestimmungen nur geringe Schwankungen gezeigt. Als Fleisch haben wir mageren Rindslendenbraten und Oberschall verwendet, von welchen bei der Verteilung soweit wie möglich Fett und Sehnen entfernt wurden. Die Fleischportionen wurden gleichzeitig am Anfang der Periode abgewogen und bis zur Benutzung bei $-1°$ bis $-6°$ C gefroren (im Frigoapparat) aufbewahrt. Butter und Milch waren gleichfalls gefroren. Ebenso wurde der Kleber für die ganze Periode auf einmal gewonnen, eingeteilt und wie die anderen Nahrungsmittel gefroren aufbewahrt. Als Mehl wurde das beste weiße ungarische Weizenmehl verwendet. Fleisch und Kleber wurden von mir, die anderen Nahrungsmittel von einem Laboranten abgewogen. Die Speisen haben wir im Institut gekocht und die Versuchsperson hat sie quantitativ aus dem zum Kochen benutzten Topf gegessen. Das Fleisch wurde entweder als Braten oder als „Gulyás“ zubereitet, das Fett, in dem das Fleisch gebraten worden war, verwendeten wir zur Bereitung der Kartoffeln. Das Mehl und der Kleber wurden zu Grieß- oder Marmeladennudeln verarbeitet, N- und Trockensubstanzgehalt des Wassers, in dem die Kartoffeln und Nudeln gekocht wurden, bestimmten wir. In den Nahrungsmitteln stellten wir den N-Gehalt nach Kjeldahl, die Trockensubstanz durch Trocknen bei 100° C, den Fettgehalt nach Liebermann - Székely fest. In den Erbsen haben wir die Stärke, in den Datteln usw. den Extraktgehalt bestimmt.

Die Versuchsperson hat sich während der ganzen Versuchsdauer, ausgenommen an den in der Tabelle bezeichneten Tagen, vollkommen wohl gefühlt und Laboratoriumsarbeit verrichtet. Der Urin wurde von 8 Uhr früh bis 8 Uhr früh des nächsten Tages gesammelt und gleich verarbeitet; wurde er einige Tage auf-

bewahrt, so versetzten wir ihn mit Salzsäure und stellten ihn in den Eisschrank. Die Faeces wurden mit 10% konzentrierter Schwefelsäure gleichmäßig gemischt und der so erhaltene Brei analysiert, der N-Gehalt wurde nach Kjeldahl, das Fett nach Liebermann - Székely, die Stärke durch Verzuckerung mit 2% HCl bestimmt. In einigen Fällen wurde der Fettgehalt der Faeces auch durch Ätherextraktion bestimmt. Die Abgrenzung des Kotes war durch die Reste der gegebenen Trauben und Feigen nicht möglich. Dadurch konnten wir die Kotbestandteile nur auf größere Zeitabschnitte verteilen und die Ausnutzung dieser nur da für kleinere Perioden gesondert berechnen, wo die Berechnung durch die Entleerungszeiten des Kotes ermöglicht wurde. Da die Ausnutzung der verabreichten Speisen eine gute war und die Eiweißausnutzung bei Fleisch und Weißmehl annähernd dieselbe ist, so ist der durch unser Verfahren verursachte Fehler gering.

Die Nahrung setzte sich in den einzelnen Perioden folgendermaßen zusammen:

P. 1. 8. bis 9. X. zum Frühstück: 30 g Butter, 100 g Honig, 60 g Zwieback. Zum Mittag: 1 Maggi-Bouillonwürfel, 20 g Sago, 70 g Fleisch, 100 g Kartoffeln, 40 g Fett, 200 g Äpfel, 30 g Zucker, 30 g Zwieback. Zum Nachtmahl: 70 g Fleisch, 50 g Reis, 40 g Fett, 200 g Äpfel, 30 g Zucker, 30 g Zwieback. Der Zwieback wurde aus Kartoffelmehl und Cocosfett und etwas Backpulver hergestellt. Diese Kost enthielt 40,4 g Eiweiß und 2825 Calorien.

10. bis 13. X. zum Frühstück: Tee und 15 g Zucker, 50 g Honig. Zum Mittag: 1 Maggi-Bouillonwürfel, 20 g Sago, 70 g Fleisch, 40 g Fett, 100 g Kartoffeln, 100 g Reis, 200 g Äpfel, 30 g Zucker. Zum Nachtmahl: 70 g Fleisch, 40 g Fett, 50 g Reis, 200 g Äpfel, 30 g Zucker, 50 g Honig. Außerdem 60 g Zucker in Limonade genossen. Diese Nahrungszusammensetzung enthielt 45,8 g Eiweiß und 2775 Calorien. Am 10. X. nahm die Versuchsperson zufälligerweise 340 Calorien weniger.

P. 2. 14. bis 18. X. zum Frühstück: 150 ccm Milch, 50 ccm Kaffee, 50 g Honig, 30 g Zwieback aus Kartoffelmehl, 15 g Zucker. Zum Mittag: 100 g Kartoffeln, 70 g Fleisch, 40 g Fett, 110 g Weizenmehl, 20 g Grieß, 200 g Äpfel, 15 g Zucker. Zum Nachtmahl: 70 g Fleisch, 40 g Fett, 100 g Reis, 200 g Äpfel, 30 g Zucker. Außerdem 30 g Zucker. Die Kost enthielt 60,3 g Eiweiß und 2770 Calorien.

P. 3. 19. bis 23. X. zum Frühstück: 15 g Zucker, 30 g Zwieback aus Erbsen, 50 g Honig. Zum Mittag: 150 g Erbsen, 60 g Kartoffelmehl, 40 g Speck, 5 g Fett, 200 g Äpfel, 30 g Zucker, 50 g Aprikosenmarmelade. Zum Nachtmahl: 100 g Ernsen, 25 g Fett, 35 g Kartoffelmehl, 200 g Äpfel, 20 g Zucker, 50 g Honig. Außerdem 15 g Zucker. Diese Kost enthielt 60,3 g Eiweiß, 2970 Calorien.

P. 4. 24. bis 26. X. zum Frühstück: 15 g Zucker, 50 g Honig. Zum Mittag: 225 g Erbsen, 40 g Speck, 30 g Kartoffelmehl, 200 g Äpfel, 15 g Zucker. Zum Nachtmahl: 150 g Erbsen, 30 g Fett, 30 g Kartoffelmehl, 200 g Äpfel, 15 g Zucker. Außerdem 150 g Erbsenzwieback. Der Zwieback wurde von fein gemahlenem Erbsenmehl mit Zusatz von Butter, $NaHCO_3$ und Salzsäure bereitet. Diese Kost enthielt 110 g Eiweiß und 3170 Calorien.

P. 5. 27. bis 31. X. zum Frühstück: 50 g Honig, 15 g Zucker. Zum Mittag: 180 g Fleisch, 200 g Kartoffeln, 130 g Weizenmehl und Grieß, 70 g Fett, 200 g Äpfel, 30 g Zucker, 50 g Aprikosenmarmelade. Zum Nachtmahl: 155 g Fleisch, 65 g Fett, 150 g Reis, 200 g Äpfel, 30 g Zucker, 35 g Honig. 103,7 g Eiweiß, 3780 Calorien.

P. 6. 4. bis 7. XI. zum Frühstück: 50 g Honig, 15 g Zucker. Zum Mittag: 180 g Fleisch, 200 g Kartoffeln, 100 g Weizenmehl, 70 g Fett, 200 g Äpfel, 15 g Zucker, 50 g Aprikosenmarmelade. Zum Nachtmahl: 140 g Fleisch, 65 g Fett, 50 g Reis, 200 g Kartoffeln, 200 g Äpfel, 15 g Zucker, 40 g Honig. Außerdem 15 g Zucker = 95 g Eiweiß, 3160 Calorien.

P. 7 8. bis 10. XI. zum Frühstück: 50 g Honig, 15 g Zucker. Zum Mittag: 190 g Erbsen, 40 g Speck, 20 g Fett, 30 g Kartoffelmehl, 200 g Äpfel, 30 g Zucker. Zum Nachtmahl: 150 g Erbsen, 40 g Fett, 30 g Kartoffelmehl, 200 g Äpfel. Außerdem 260 g Erbsenzwieback. 126 g Eiweiß, 3480 Calorien. Am 8. XI. wurden nur 116 g Eiweiß gegeben.

P. 8. 11. bis 14. XI. 300 g Weizenmehl mit 99 g feuchtem Kleber gemischt, 50 g Fett, 100 g Mandeln, 100 g Trauben (trocken) oder Datteln, 600 g Äpfel, 100 g Honig, 50 g Aprikosenmarmelade, 15 g Zucker. 15. bis 17. XI. statt 100 g Mandeln 60 g Weizenmehl, 45 g feuchten Kleber, 50 g Datteln, 15 g Fett. 88 g Eiweiß, 3280 Calorien, am 15. bis 17. XI. nur 84 g Eiweiß, 3350 Calorien.

P. 9. 18. bis 24. XI. zum Frühstück: 50 g Honig, 15 g Zucker. Zum Mittag: 180 g Fleisch, 400 g Kartoffeln, 56 g Fett, 200 g Äpfel, 30 g Zucker, 50 g Aprikosenmarmelade, 40 g Datteln. Zum Nachtmahl: 140 g Fleisch, 65 g Fett, 50 g Reis, 200 g Kartoffeln, 200 g Äpfel, 30 g Zucker, 60 g Honig. Dazu noch 15 g Zucker = 91 g Eiweiß, 3200 Calorien.

P. 10. 25. bis 29. XI. zum Frühstück: 50 g Honig, 15 g Zucker. Zum Mittag: 350 g Fleisch, 400 g Kartoffeln, 56 g Fett, 200 g Äpfel, 30 g Zucker, 50 g Aprikosenmarmelade. Zum Nachtmahl: 300 g Fleisch, 52 g Fett, 50 g Reis, 200 g Kartoffeln, 200 g Äpfel, 30 g Zucker, 40 g Datteln, 15 g Zucker: 162 g Eiweiß, 3395 Calorien.

Die Versuchsresultate sind in der beigefügten Tabelle zusammengestellt. Wie daraus zu ersehen ist, konnten wir unseren Versuchsplan nicht vollständig durchführen. Die erste Periode wurde durch Unwohlsein der Versuchsperson am 9. und 10. X. gestört. Weil wir befürchteten, dies Unwohlsein stehe mit den vorausgegangenen Eiweißverlusten in Zusammenhang, und da der aus Kartoffelmehl gebackene Zwieback sehr ungern genommen wurde, mußten wir einerseits den Eiweißgehalt der Kost etwas

erhöhen und konnten andererseits die Periode nicht genügend lange ausdehnen. Wegen des Unwohlseins der Versuchsperson sind 2 Tage von den 6 Tagen nicht verwertbar. In den folgenden 3 Tagen (dem ersten Tag der folgenden Periode zugerechnet) war die N-Ausscheidung auffallend gleichmäßig und der Durchschnitt dieser 3 Tage (33,3 g Eiweiß entsprechend) liegt wahrscheinlich dem Eiweißminimum näher als der Durchschnittswert der ganzen Periode (38,4 g). Daß in den ersten Tagen der folgenden Periode trotz steigender Harnmengen die N-Ausscheidung unverändert blieb, spricht dafür, daß wir den Wert 33 g nicht zufälligerweise erhalten haben. 33 g Eiweiß pro Tag bei einem 84 kg wiegenden Mann ist ein auffallend niedriger Wert. Umgerechnet auf 70 kg Körpergewicht ergeben sich 27,7 g, was schon den von Hindhede gegebenen Werten nahesteht. Der Caloriengehalt der Kost war während der Periode verhältnismäßig niedrig, und mit höheren Caloriengehalt hätten wir wahrscheinlich niedrigere Eiweißwerte bekommen.

Die folgenden 2 Perioden (2 und 3), durch die wir den Eiweißansatz bei niedrigerem Eiweißgehalt der Kost untersuchen wollten, zeigen keine Eiweißretention. Wahrscheinlich war der Caloriengehalt der Kost ungenügend. Die 3. Periode läßt immerhin die Schlußfolgerung zu, daß man auch bei Erbsen mit weniger als 50 g aufgenommenem Eiweiß N-Gleichgewicht erreichen kann.

In den folgenden Perioden enthielt die Nahrung mehr Eiweiß und etwas mehr Calorien. Zum Vergleich dienen 3 Perioden, in denen das Eiweiß größtenteils in Fleisch gegeben wurde (Per. 5, 6,9). In der 5. Periode haben wir, durch ein Versehen, mehr Calorien gegeben. Die Abgrenzung des Kotes ist gegen die vorangehende Periode mit Erbsen ebenso wie gegen die nachfolgende Periode unvollkommen. Die Traubenkerne, die zur Abgrenzung dienen sollten, waren schon in dem charakteristischen Erbsenkot vorhanden und auch in dem danach entleerten. Dieser Umstand kann 1—2 g Unterschied verursachen bei der Berechnung des Koteiweißes. Ebenso haben wir den sehr geringen Eiweißwert am 28. X., der von der Verminderung der Urinmenge herrührt, bei der Berechnung ausgelassen. Bei Annahme von 8 g Koteiweiß bekommen wir für diese Periode (Per. 5) einen täglichen Eiweißansatz von 28,3 g bei 95,7 g Eiweißaufnahme. In der 6. Periode beträgt der Ansatz bei 85 g Eiweißaufnahme und 3070 Netto-

calorien 21,1 g. Die Periode 9 wurde am 20. durch starken Kopfschmerz und Unwohlsein gestört, und den folgenden Tag war die N-Ausscheidung eine erhöhte. Wenn wir den Tag des Unwohlseins und den folgenden Tag auslassen (natürlich auch den ersten Tag der Periode) bekommen wir eine 61,7 g Eiweiß entsprechende N-Ausscheidung und 18,4 Apposition. Rechnen wir die erwähnten 2 Tage hinzu, so beträgt der Durchschnitt 63,3 g und der Ansatz 16,8 g bei 80 g Eiweißaufnahme. Der wirkliche Eiweißansatz variiert, vielleicht wegen der Unmöglichkeit der genauen Abgrenzung des Kotes, um 1—2 g von dem angegebenen, wahrscheinlicherweise aber in positivem Sinne.

Die Perioden, in denen Erbsen in großer Menge aufgenommen werden sollten, mußten wegen Überlastung des Magendarmsystems der Versuchsperson kürzer bemessen werden. Die Überlastung zeigte sich hauptsächlich in der Periode 7, in der die Versuchsperson nur mit der größten Anstrengung die vorgeschriebene Nahrung aufnehmen konnte, und am 3. Tag wurde auch die Ausnutzung verschlechtert. Die 2 letzten Tage der 4. Periode zeigen einen Ansatz von 15,2 g bei 88 g Eiweißaufnahme und 2970 Nettocalorien. Die Beurteilung der Periode 7 wird dadurch erschwert, daß während dieser, Ausscheidung und Aufnahme nicht konstant sind. In den 2 Kotentleerungen dieser Periode war 84 g Eiweiß vorhanden, so mußten wir einen Teil (8 g) des Koteiweißes vom 12. (welches sichtlich mit viel Erbsen vermengt war) auch dazunehmen, wir bekommen für diese Periode täglich 30,6 g Koteiweiß. Als Durchschnitt der N-Ausscheidung von den Tagen 9—10 berechnet, ergibt sich 22,8 g Ansatz bei 92,1 g Eiweißaufnahme. Die Ausnutzung des Caloriengehaltes der Nahrung war entsprechend. In den ersten 2 Tagen gingen täglich 170, am 3. 400 Cal. im Kot verloren, so daß im Durchschnitt die Menge der aufgenommenen Calorien etwas größer war (besonders am 2. Tag der Periode) als in den entsprechenden Fleischperioden. — Soweit man aus diesen beiden kurzen Perioden Folgerungen ziehen darf, scheinen die Eiweißstoffe der Erbsen dem Fleischeiweiße hinsichtlich des Eiweißansatzes gleichwertig zu sein.

Ausgesprochene Abweichung in der Verwertung des Eiweißes gegenüber den Fleischperioden zeigt die Periode 8. In den ersten 4 Tagen wurde das Eiweiß durch Weizen und Mandeln geliefert und zwar 25 g in Mandeln und 57,5 g in feinstem Weizenmehl.

(Dazu kam noch der N-Gehalt der anderen Nahrungsmittel, der 5,5 g Eiweiß entspricht.) In den letzten 3 Tagen wurde ausschließlich Weizenmehl gegeben. Die Ausnutzung scheint in den letzten Tagen etwas besser gewesen zu sein, wie zu erwarten war, daß wir trotz der etwas geringeren Eiweißgabe der letzten 3 Tage für die ganze Periode durchschnittlich 76 g Nettoeiweißaufnahme annehmen können. Die N-Ausscheidung entspricht 73,5 g, in den letzten 3 Tagen 75,9 g. In der folgenden Fleischperiode ist der Eiweißumsatz, trotz einer Mehraufnahme von 4 g, 12 g geringer. Die Harnmenge bewegt sich während der 8. Periode innerhalb enger Grenzen und ist immer niedriger als während der nachfolgenden Fleischperiode.

Sollte jemand geneigt sein, das Vorhandensein eines Unterschiedes zwischen der Periode 8 und 9 zu bezweifeln und glauben, daß sich in der Periode 8 möglicherweise Abbauprodukte der früheren Erbsenperiode entleerten, so spricht gegen diese Einwendung einerseits die 2. Versuchsreihe, andererseits der Umstand, daß wir nie eine Verschiebung der N-Entleerung beobachten konnten. Auch nach der 1. Erbsenperiode stellte sich die N-Ausscheidung, wie während der ganzen Versuchsreihe, schon am 2. Tage auf den Wert der folgenden Periode ein. Auch der Umstand, daß die N-Ausscheidung während der ganzen Erbsenperiode hoch bleibt und in der folgenden Fleischperiode sofort auf einen niedrigeren Wert fällt, zeigt, daß zwischen diesen Perioden ein wirklicher und kein zufälliger Unterschied vorhanden war.

In der 2. Versuchsreihe wollten wir die für Weizenmehl erhaltenen Resultate kontrollieren. Während der 2. Abmagerungskur hatte das Körpergewicht der Versuchsperson von 90 kg auf 78 kg abgenommen und 708 g Eiweiß verloren. Aufnahme und Abgabe wurden auch während der Hungerkur kontrolliert, da wir auch diese Zeit für unsere Versuche ausnutzen wollten. Die 31 Tage der verminderten Kost waren in 3 Perioden eingeteilt: 14 Tage mit Fleischkost, 7 Tage Weizenmehlkost und 10 Tage Fleischkost. Dieser Abmagerungskur folgt eine längere Fleischperiode, dieser eine 6tägige Periode mit Weizenmehl. Die nachfolgende Fleischperiode war leider durch einen heftigen Dickdarmkatarrh gestört, so daß wir sie nicht verwerten konnten. Da sich der Dickdarmkatarrh nach Wiederaufnahme der Versuche wieder

zeigte, mußten wir ihre Fortsetzung aufgeben. Während der Weizenmehlperiode und auoh in den ersten Tagen der folgenden Periode war das Wohlbefinden jedoch ein ungestörtes und die diarrhöischen Stühle folgten den am 3. VI. entleerten größtenteils normalen.

Die Zusammenstellung der Kost war folgende:

Periode X, 15 g Zucker, 30 g Fett, 200 g Fleisch, 10 g Sago, 300 g Kartoffeln, 50 g Zwieback, 20 g Kren. 59,6 g Eiweiß, 1447 Calorien.

Periode 11, 17. bis 23. IV.: 15 g Zucker, 150 g Weizenmehl, 98,5 g feuchter Kleber, 20 g Grieß, 40 g Zwieback, 150 g Feigen, 56,1 g Eiweiß, 1500 Calorien.

Periode 12, 27. IV. bis 3. V. wie Periode 10.

Periode 13, 4. bis 13. V. 30 g Zucker, 75 g Feigen, 75 g Malagatrauben, 150 g Datteln, 400 g Fleisch, 600 g Kartoffeln, 120 g Fett, 10 g Mehl, 60 g Honig. 106,5 g Eiweiß, 3400 Calorien.

Periode 14, 14. bis 19. V. 300 g Weizenmehl, 215 g feuchter Kleber, 50 g Grieß, 85 g Fett, 150 g Kartoffeln, 150 g Datteln, 100 g Malagatrauben, 15 g Zucker. 106,3 g Eiweiß, 3184 Calorien.

Die Calorienaufnahme war während der Perioden der Abmagerungskur ganz gleichmäßig. Doch scheint der Eiweißverlust während der zwischen 2 Fleischperioden eingeschalteten Weizenmehlperiode bedeutend höher zu sein als in den Fleischperioden. Infolge der Unsicherheit der Kotabgrenzung und je nachdem, ob wir die Verluste der ersten Tage der Abmagerungskur bei der Berechnung des Durchschnittes verwenden, sind die erhaltenen Zahlen etwas schwankend.

Für die 1. Periode bekommen wir einen täglichen Verlust von 19—24 g Eiweiß, für die 2. 30—32, für die 3. 16—17 g. Wir wollen an diese Zahlen, die während einer intensiven Abmagerungskur gewonnen wurden und bei deren Zustandekommen uns eventuell nicht bekannte Umstände mitgewirkt haben können, keine weiteren Schlußfolgerungen knüpfen. Doch halten wir es für bemerkenswert, daß sich bei unserer Versuchsperson, auch bei einer Abmagerungskur, der große Unterschied zwischen Fleisch- und Weizenmehleiweiß zeigte und können wir diese Tatsache als Bekräftigung dafür ansehen, daß wir unsere Versuchsergebnisse für reelle halten dürfen.

Der Eiweißansatz in der folgenden Periode ist etwas geringer als in den entsprechenden Fleischperioden der ersten Versuchsreihe. Nach Übergang auf die Weizenmehlkost steigt die N-Ausscheidung sofort und bleibt auch höher. Gegenüber dem Eiweiß-

ansatz von 17,3 g der 14. Periode haben wir täglich 3,3 g Eiweißverlust. Die N-Ausscheidung sinkt nur an einem Tage des Versuches (am 15.), was durch den starken Abfall der Harnmenge motiviert ist. Der N-Gehalt des Kotes wurde wegen der Unsicherheit der Abgrenzung gleichmäßig auf beide Perioden verteilt. Soweit wir eine Abgrenzung auf Grund des Zeitpunktes der Entleerungen vornehmen können, war in der Weizenmehlperiode die Ausnützung etwas schlechter, jedenfalls nicht höher als in der früheren. Die Verschiedenheit der Ausnützung mußte die Differenz des Eiweißansatzes naturgemäß erhöhen.

Der Caloriengehalt der Weizenmehlperiode ist etwas geringer als der der vorhergehenden Periode. Wenn wir den Calorienwert des angesetzten Eiweißes bei der Fleischperiode in Abzug bringen, beträgt der Unterschied zwischen dem Caloriengehalt der Perioden 140 Calorien pro Tag. Als Beweis dafür, daß nicht der Unterschied in dem Caloriengehalt die Ursache des Ausbleibens des Eiweißansatzes in der Weizenmehlperiode ist, können wir die Fleischperioden der ersten Versuchsreihe heranziehen. In der 4. Periode ist der Eiweißansatz im Vergleich mit den folgenden Perioden nur unwesentlich erhöht, trotzdem die Kost in dieser Periode 630 Calorien mehr enthält. In der letzten Periode, in der der Caloriengehalt, nach Abzug des Calorienwertes des angesetzten Eiweißes den anderen Perioden gleichkommt, wurde durch Steigerung des Eiweißgehaltes der Kost der Ansatz stark gesteigert.

Die 2. Versuchsreihe, die zwar durch Wegbleiben der letzten Fleischperiode gestört ist, zeigt eindeutig, daß bei unserer Versuchsperson unter unseren Versuchsbedingungen, daß Weizenmehl zum Eiweißansatz weniger geeignet war als das Fleisch.

Warum haben unsere Ansatzversuche andere Resultate gegeben als die am Anfang zitierten Minimumversuche? Man muß in erster Reihe die Unterschiede der Versuchsanordnungen in Betracht ziehen. Wir halten es für ganz unwahrscheinlich, daß unsere Daten durch Zufall zustande gekommen sind, welcher Zufall durch die kurze Ausdehnung der Perioden bedingt wäre. Die N-Ausscheidung stellt sich gewöhnlich am 2. Tage der Periode auf den Durchschnittswert und abgesehen von einigen Tagen, an denen die Versuchsperson sich unwohl gefühlt hat, ist die Ausscheidung regelmäßig und schwankt nur mit dem Fallen und Steigen der täglichen Urinmenge. Ein Ansatzversuch läßt keine

Tabelle I.

Datum	Periode	In der täglichen Kost: Eiweiß	In der täglichen Kost: Calorien	Kot g	Im Kot: Eiweiß g	Im Kot: Calorien	Aufgenommen: Eiweiß g	Aufgenommen: Calorien	Tägliche Harnmenge g	Eiweiß entsprechend dem Harn N. g	Bilanz g	Bemerkungen
8. X.	1. Gemischte Kost (hauptsächl. Fleisch)	40,4 g,	2825	150,8	15,8	184	34,2	2770	510	39,9 } 39,2		Starkes
9. X.		davon 30,8 g						2770	1000	38,5	−5,0	Kopfweh
10. X.		Fleischeiw.	2435					2380	1200	37,7		Unwohlsein, ½ g
11. X.		45,8 g	2775				39,6	2720	2725	48,7		Pyramidon
12. X.		30 g Fleisch-						2720	2163	33,1 } 38,4		
13. X.		eiweiß						2720	1240	33,9	+1,2	
			Im Durchschnitt:		6,2	55						
14. X.	2. Gemischte Kost (hauptsächl. Fleisch)	60,8 g	2770	135	21,8	180			1560	33,0		
15. X.		30,8 g							1490	50,3		
16. X.		Fleisch-							1307	48,6		
17. X.		eiweiß							1630	52,3		
18. X.									1985	55,5		
			Im Durchschnitt:		7,5	68	52,8	2700		50,4	+2,4	
19. X.	3. Erbsen	68,0 g, da-	2970	237	34,4	310			1705	52,4		
20. X.		von 60,0 g							867	39,5		
21. X.		Erbsen-		147	13,8	116			1075	48,6		
22. X.		eiweiß							817	46,8		
23. X.				320	40,0	280			1020	52,1		
			Im Durchschnitt:		13,4	103	49,6	2780		46,8	+2,8	
24. X.	4. Erbsen	110,0 g, da-	3170	123	18,0	160			1005	62,5		
25. X.		von 108,0 g							1470	74,4		
26. X.		Erbseneiw.							1292	71,2		
			Im Durchschnitt:		22,0	200	88,0	2970		72,8	+15,2	
27. X.	5. Gemischte Kost (hauptsächl. Fleisch)	103,7 g, da-	3780	165	22,4	200			1786	73,6		
28. X.		von 73 g		103	11,6	95			1145	63,5		Kot, haupt-
29. X.		Fleischeiw.		292	33,0	270			980	66,3		sächlich
30. X.				118	15,3	150			897	67,4		Erbsenkot
31. X.									781	67,5		
			Im Durchschnitt:		8,0	73	95,7	3700		66,1	+29,6	
1. XI.	6. Gemischte Kost (hauptsächl. Fleisch)											
2. XI.												
3. XI.												
4. XI.		95,0 g, da-	3160						1785	74,6		
5. XI.		von 70,4 g		278	31,8	300			1245	63,0		
6. XI.		Fleischeiw.							725	63,3		
7. XI.									763	65,6		
			Im Durchschnitt:		10,0	91	85,0	3070		63,9	21,1	
8. XI.	7. Erbsen	116 g	3480	196	23,2	200		3300	1030	79,2		
9. XI.		126 g, da-					98		1003	71,0		
10. XI.		von 123,5 g		580	37,8	280	86	2990	990	65,6		
		Erbseneiw.										
										71,9	+20,0	

Datum	Periode	In der täglichen Kost: Eiweiß	In der täglichen Kost: Calorien	Kot	Im Kot: Eiweiß g	Im Kot: Calorien	Aufgenommen: Eiweiß g	Aufgenommen: Calorien	Tägliche Harnmenge g	Eiweiß entsprechend dem Harn N. g	Bilanz g	Bemerkungen
11. XI.	8. Wei-	88 g, davon	3282	1110	45,9	325			812	63,0		
12. XI.	zen und	25 g Mandel-		387	17,7	260			658	65,7		
13. XI.	Mandeln	eiweiß und							715	77,3 } 74,7		
14. XI.		57,5 g Wei-zeneiweiß		305	28,1	436			787	81,1		
15. XI.		84 g, davon	3350						660	76,5		
16. XI.	Weizen	77,0 g Wei-							650	70,0 } 76,0		
17. XI.		zeneiweiß							747	81,3		
		Im Durchschnitt:			12,0	195	76,0	3080		75,3	+0,7	
18. XI.	9. Gemischte Kost (hauptsächlich Fleisch)			95	11,3	180			720	71,1		
19. XI.		91,0 g,	3200	380	36,0	250			502	61,6		
20. XI.		davon 65,5 g							1040	60,2		
21. XI.		Fleischeiw.		127	16,9	148			1047	72,8		Starkes
22. XI.									1345	58,5		Kopfweh,
23. XI.									916	61,9		Unwohlsein
24. XI.									1058	63,0 } 61,7		
		Im Durchschnitt:			10,9	110	80,1	3090		63,3	+16,3	
25. XI.	10. Gemischte Kost (hauptsächl. Fleisch)	162 g, da-	3395	188	22,7	220			1235	79,5		
26. XI.		von 143,0 g		120	15,8	150			1208	107,0		
27. XI.		Fleischeiw.		} 375	46,6	425			1157	107,0		
28. XI.									1580	115,0		
29. XI.									1076	80,7		
30. XI.				180	22	216						
		Im Durchschnitt:			16,9	150	1451	3240		102,2	+42,9	
3. IV.	11. Gemischte Kost (hauptsächlich Fleisch)	59,6 g, da-	1447						885	88,6		
4. IV.		von 45,0 g							926	99,7		
5. IV.		Fleischeiw.		115,4	11,4	129			1126	100,2		
6. IV.									645	74,7		
7. IV.									825	88,6		
8. IV.				222,8	22,5	192			755	81,2		
9. IV.									730	74,6		
10. IV.									710	72,8		
11. IV.				230,5	26,6	250			895	88,0		
12. IV.									810	72,7		
13. IV.				233,4	27,4	231			605	62,9		
14. IV.									700	65,7		
15. IV.									660	68,4		
16. IV.									700	73,6		
		Im Durchschnitt:			7,5	70,5	52,1	1376	von 10./16.	71,5	-19,4	
17. IV.		56,1 g, da-	1500						670	75,5		
18. IV.		von 51,6 g		298	25,0	222			730	82,3		
19. IV.	12.	Weizeneiw.							450	66,9		
20. IV.	Weizen								575	77,3		
21. IV.				306	29,4	346			985	86,4		
22. IV.									550	77,6		
23. IV.									760	79,2		
		Im Durchschnitt:			9,9	100	46,2	1400		78,2	-32,0	

Datum	Periode	In der täglichen Kost: Eiweiß	In der täglichen Kost: Calorien	Kot	Im Kot: Eiweiß g	Im Kot: Calorien	Aufgenommen: Eiweiß g	Aufgenommen: Calorien	Tägliche Harnmenge g	Eiweiß entsprechend dem Harn N. g	Bilanz g	Bemerkungen
24. IV.	13. Gemischte Kost (hauptsächlich Fleisch)	59,6 g, davon 45,0 g Fleischeiw.	1447						795	66,9		
25. IV.				402	38,0	400			1470	77,0		
26. IV.									1260	61,2		
27. IV.									720	63,8		
28. IV.									970	75,4		
29. IV.				825	27,5	265			1240	65,1		
30. IV.									1950	66,9		
1. V.									1220	62,2		
2. V.				276	23,0	220			1605	68,2		
3. V.									1875	64,8		
		Im Durchschnitt:			9,4	98	50,2	1350		67,2	-17,0	
4. V.	14. Gemischte Kost (hauptsächlich Fleisch)	106,5 g, davon 83,6 g Fleischeiw.	3400						1300	62,9		
5. V.				599	48,5	486			1020	76,2		
6. V.									3300	80,7		
7. V.									2230	74,4		
8. V.									1155	68,3		
9. V.				445	38,7	415			1880	78,0		
10. V.				578	38,9	326			1450	70,4		
11. V.									1380	74,2		
12. V.									1700	83,2		
13. V.									1210	74,2		
						Im Durchschnitt:	92,9	3256		75,6	+17,3	
14. V.	15. Weizen	106,3 g, davon 97,9 g Weizeneiw.	3184						2005	91,1		
15. V.									1470	73,8		
16. V.				803	52,9	512			1400	111,5		
17. V.									1535	89,2		
18. V.									1140	111,0		
19. V.				795	59,0	611			1220	94,8		
		Im Durchschnitt:	von 4./18.		13,6	144	92,7 von 14./19.	3040		96,0	-3,3	

langen Perioden zu. Unsere Versuchsanordnung unterscheidet sich in 2 Punkten wesentlich sowohl von den Versuchen von Hindhede als auch von Abderhalden, auch abgesehen vom prinzipiellen Unterschied. Erstens ist der Caloriengehalt der Kost bei uns wesentlich niedriger. Es ist nicht ausgeschlossen, daß bei sehr hoher Calorien- oder Kohlenhydratzufuhr der Organismus die Eiweißstoffe anders verwertet als bei niedriger Calorienzufuhr. Zweitens haben wir gut ausnutzbares Mehl benützt, während bei den Versuchen beider Autoren, hauptsächlich aber bei den Frucht- und Brotversuchen von Hindhede, die mit den Faeces abgehende Eiweißmenge sehr hoch ist (30—40 g). Bei wesentlichem Unterschied in der Ausnützbarkeit kann der Zustand, in dem das Eiweiß

aufgenommen wird, stark differieren und es ist auch möglich, daß der Grund, warum das Eiweißminimum bei schlecht ausnützbarem Brot ebenso niedrig ist wie bei den Kartoffeln, darin liegt, daß von den Eiweißstoffen, die mit den Faeces abgehen, solche Bestandteile aufgenommen worden sind, die den Wert des aufgesogenen Eiweißes erhöhen. Es ist zwar wahrscheinlich, daß die erwähnten Umstände keine große Rolle spielen, doch sicher ist dies nur experimentell zu entscheiden.

Aller Wahrscheinlichkeit nach unterscheiden sich die Resultate wegen der Verschiedenheit der Fragestellung. Der Eiweißansatz ist wahrscheinlich eine andere Funktion des Organismus als das Zurückhalten der Eiweißstoffe und stellt andere Ansprüche gegenüber der Beschaffenheit der aufgenommenen Eiweißstoffe und vielleicht auch gegenüber dem Organismus und deshalb können die Unterschiede zwischen den einzelnen Eiweißstoffen schärfer hervortreten als bei Minimumversuchen. Diese Annahme bot uns die Anregung zur Ausführung der Versuche und eine Möglichkeit dieser Annahme wird auch von Abderhalden zugelassen[1]).

Endlich können wir auch die Möglichkeit nicht ausschließen, daß bei der Verwertung der Eiweißstoffe zwischen den einzelnen Individuen große individuelle Unterschiede vorhanden sein können und daß die von uns gefundene Regel nicht für jeden Menschen gültig ist. Vielleicht ist sie auch der Ausdruck einer Stoffwechselanomalie, welche Annahme bei einem stark zu Fettleibigkeit neigenden Individuum nicht fernliegend ist. Es ist gewiß nicht zulässig, aus Resultaten, die bei einer einzigen Versuchsperson gefunden worden sind, allgemeine Schlußfolgerungen zu ziehen.

Außer den erwähnten Möglichkeiten, nach welchen der Grund der Unterschiede in den Resultaten der Minimum- und Ansatzversuche selbst in den Eiweißstoffen liegt, bietet sich noch folgende. Bekanntlich kommt der Eiweißansatz nur dann zustande, wenn der Organismus das Eiweiß nötig hat. In den durch Hindhede mitgeteilten Daten finden wir sehr interessante Hinweise darauf, daß auch bei sehr geringer Eiweißzufuhr das Eiweißbedürfnis die Richtung der Schwankungen um das Eiweißgleichgewicht entscheidet und das Gleichgewicht stark beeinflußt. Wenn das

[1]) Lehrbuch der physiologischen Chemie, II. Aufl., S. 1205.

Eiweißminimum erreicht ist, ist die Bilanz positiv oder negativ, je nachdem das Körpergewicht steigt oder fällt. Z. B. bei den Versuchen mit Gerste[1]) hält eine Versuchsperson (Landsmoe), dessen Körpergewicht steigt, von 39,5 g täglicher Eiweißmenge 7,3 g zurück, später, bei fallendem Körpergewicht, bei Aufnahme von 50,9 g täglicher Eiweißmenge (und 3500 Cal.) verliert sie täglich 13 g Eiweiß. Die andere Versuchsperson, Fr. Madsen, die bei Kartoffel- und Brotkost mit 21 g täglicher Eiweißmenge im Gleichgewicht war, verliert bei den Gerstenversuchen neben 50 g aufgenommenem Eiweiß täglich 2 g, während der Dauer des Versuches 350 g (der Caloriengehalt der Kost war ungefähr 4000 Calorien täglich). Wir haben das Bedürfnis des Eiweißansatzes dadurch gesichert, daß dem Ansatzversuch ein großer Eiweißverlust folgt[2]). Doch kann man nicht ausschließen, daß die Kost selbst die Neigung des Organismus, Eiweiß aufzunehmen, stark beeinflußt. Es ist auffallend, daß, während bei Fleischkost die Eiweißaufnahme hoch ist, bei der Weizenmehlkost die Aufnahme nicht nur geringer ist, sondern ganz aufhört. Es ist kaum anzunehmen, daß 90 g Weizenmehleiweiß keine Möglichkeit zur Eiweißaufnahme bieten sollte, während von gleicher Menge Fleischeiweiß 17 g zurückgehalten wurden, oder, wie bei der 1. Versuchsreihe, von 85 g 21 g. Wir müssen daran denken, daß dieser Unterschied nicht durch den Unterschied der Eiweißstoffe verursacht ist, sondern daß wir in dem Ausbleiben des Eiweißzusatzes dieselbe Erscheinung beobachten, die wir auch an den mit reinen Nährstoffen ernährten jungen Tieren, bei welchen das Wachstum ausbleibt, beobachten können. Der Organismus unserer Versuchsperson ist während der Abmagerungsperiode, in welcher er erst 18 kg, später 12 kg, verloren hat, wahrscheinlich an mehreren wichtigen Bestandteilen verarmt. Es ist möglich, daß der Eiweißansatz nur mit der Aufnahme von gewissen, von dem Eiweiß verschiedener Substanzen parallel gegangen ist und diese Stoffe, trotzdem wir auf die Abwechslung der Zusammensetzung der Kost großes Gewicht gelegt haben, in der Mehlkost nicht vorhanden waren.

[1]) Skandinav. Arch. f. Physiol. **35**.

[2]) Dieser Versuch ist auch nicht direkt mit unseren Ansatzversuchen vergleichbar, weil die zum Vergleich dienende Fleischperiode fehlt und die aufgenommenen Calorien viel höher sind als in unseren Versuchen.

Wir halten zwar unsere Versuche für richtig, wollen aber nicht vergessen, daß sie nur an einer und auch nicht ganz normalen Person und nur mit einer Nahrungszusammensetzung ausgeführt wurden.

Zusammenfassung.

Wir haben gefunden, daß bei gleicher Stickstoff- und Calorienaufnahme (Resorption), nach starker Abmagerung, bei Fleischkost bedeutend mehr Stickstoff angesetzt wird als bei einer Kost, deren Eiweiß hauptsächlich aus Weizenmehl stammt.

Interferometrische Analyse der Immunpräcipitation.

Von

R. Doerr und **W. Berger.**

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Basel.)

(Eingegangen am 18. Juli 1921.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Van Calcar hat im Jahre 1908 die Hypothese formuliert, daß das Präcipitin ein fermentartiger Stoff sei, welcher die Fähigkeit besitzt, das zugehörige Eiweißantigen in vivo und in vitro zu zerlegen; bei dieser Zerlegung sollen Säuren (Aminosäuren, sauer reagierende Polypeptide) entstehen, welche die alkalischen Substanzen des Serums neutralisieren und durch diese „indirekte Alkalientziehung" das Globulin niederschlagen. Die akuten Krankheitserscheinungen, welche nach wiederholten Injektionen einer bestimmten Eiweißart auftreten, betrachtete van Calcar als Ausdruck einer Vergiftung durch die im Organismus gebildeten Zerfallsprodukte des eingespritzten Proteins; die Tatsache, daß Eiweißspaltprodukte wie Albumosen, Aminosäuren ziemlich stark toxisch wirken können und die Beobachtung, daß man durch die Vitroreaktion von Präcipitinogen und Präcipitin Flüssigkeiten erhält, welche beim normalen Tiere ähnliche Störungen auslösen wie die Reinjektion des Antigens beim spezifisch vorbehandelten, genügten ihm als Beweise für seine Auffassung von der Ursache anaphylaktischer Prozesse.

In dieser Konzeption tritt der Antikörper als ein Agens auf, welches imstande ist, am Antigenmolekül tiefgreifende chemische Veränderungen hervorzurufen. Wie Bordet in seinem Werke „Traité de l'immunité" erst vor kurzer Zeit nachdrücklichst betont hat, kennt man jedoch bisher keine einzige Wirkung eines Antikörpers, die mit einer Antigenzersetzung verbunden wäre. Daß das Antigen bei der Reaktion mit dem Antikörper

intakt bleibt, erhellt ja schon daraus, daß man den neutralen Komplex auch nach langer Dauer seines Bestandes wieder dissoziieren und selbst sehr labile Antigene mit allen ihren ursprünglichen Eigenschaften restituieren kann (Roux und Calmette, Morgenroth und seine Mitarbeiter, Busson und Löwenstein). Wählt man als Antigene empfindliche Zellarten wie Erythrocyten, bei denen sich Änderungen im Eiweißbestand oder gar bis zu den Aminosäuren reichende Verdauungsvorgänge sofort und selbst für eine grobsinnliche Betrachtung verraten müßten, so vermag man sich leicht zu überzeugen, daß ihre Verbindung mit einem spezifischen Antikörper zu keiner Alteration führt, die sich morphologisch oder chemisch fassen ließe. Erst die Intervention des Komplementes bewirkt den Eintritt der Cytolyse oder anderer cytotoxischer Effekte; aber auch die Lyse (Hämolyse, Bakteriolyse) darf nach dem derzeitigen Stand unserer Kenntnisse nicht als Verdauung der antigenhaltigen Zellen aufgefaßt werden (Nolf, Misch, Jobling und Petersen, Bordet, Doerr), und es existiert keine sichergestellte Tatsache, die uns berechtigen würde, dem „Komplement" die Funktionen einer Protease zuzuschreiben (Bronfenbrenner, Bordet, Jobling und Petersen, Lampl und Landsteiner).

Nun hat in den letzten Jahren P. Hirsch die Vorstellungen, welche sich van Calcar über den Mechanismus der Immunpräcipitation gebildet hatte, wieder aufgegriffen und sie in fast unveränderter Form als „Arbeitshypothese" übernommen. Hirsch faßt die Präcipitation selbst als einen rein kolloidchemischen Prozeß auf, der infolge einer Änderung der Wasserstoffionenkonzentration in einem kolloidalen System (Gemisch von Antigen und Immunserum) zustande kommt. Die Änderung (Vermehrung) der Wasserstoffionenkonzentration soll dadurch entstehen, daß im Immunserum Abwehrfermente vorhanden sind, welche die Eiweißkörper des Antigens zu sauer reagierenden Spaltprodukten abbauen. „Der Kern des ganzen Vorganges ist also die chemische, fermentative Spaltung von artfremden Proteinen, während die spezifische Ausflockung geradezu als Folge, als ‚Nebenwirkung' erscheint" (Langenstrass).

Die von P. Hirsch für das quantitative Studium der „Abwehrfermentreaktionen" ausgearbeitete interferometrische Methode „mit ihrer außerordentlich feinen Ausdrucksfähigkeit für

minimale Änderungen der Konzentration und der Refraktion von Lösungen“ schien ihm geeignet, auch auf „diejenige Abwehrfermentreaktion, welche der spezifischen Präcipitation zugrunde liegen dürfte, neues Licht zu werfen“ (Langenstrass). In Gemeinschaft mit K. Langenstrass verwendete Hirsch zur Analyse der Immunpräcipitation eine Untersuchungstechnik, die auf folgendem Gedankengange beruht:

Vermengt man 2 Lösungen von verschiedenem Refraktions- (Interferometer-) Wert, welche chemisch miteinander nicht reagieren, so läßt sich der Interferometerwert (abgekürzt IW.) des Gemenges als additive Funktion der beiden Komponenten berechnen. Besonders einfach liegt der Fall, wenn man gleiche Volumina der beiden optisch differenten Flüssigkeiten vermischt; dann erhält man den IW. des Gemenges, wenn man einfach das arithmetische Mittel der IW. der Komponenten bestimmt. Diesem errechneten oder Sollwert der Gemenge entspricht ihre tatsächliche, direkt feststellbare Refraktion, zwar nicht mit absoluter Genauigkeit, aber doch in einem sehr weit angenäherten Grade.

Trifft jedoch die Voraussetzung nicht zu, d. h. reagieren die Flüssigkeiten resp. die in denselben gelösten Stoffe miteinander, so müssen die abgelesenen und die errechneten Werte der Gemenge nicht mehr übereinstimmen. Je nach dem Refraktionswert der neu entstehenden Substanzen kann der abgelesene Wert des Gemenges niedriger oder höher sein als der berechnete. Es ist aber selbstverständlich auch möglich, daß eine Übereinstimmung trotz chemischer Umsetzung gefunden wird, z. B. dann, wenn 2 oder mehrere chemische Reaktionen nebeneinander ablaufen, welche den IW. des Gemenges antagonistisch beeinflussen und sich dabei gegenseitig im Endeffekt kompensieren.

Hirsch und Langenstrass scheinen[1]) anzunehmen, daß eine Spaltung von Eiweißmolekülen eine Vermehrung der Refraktion notwendig nach sich ziehen muß. Bei der Immunpräcipitation müßte dann die Richtigkeit der Hypothese van Calcars dadurch zum Ausdruck gelangen, daß ein Gemenge von Präcipitinogen und Präcipitin einen IW. zeigt, der höher ist als das arithmetische Mittel der IW. der beiden Reaktionskomponenten. Doch wäre dieses Ergebnis nur in dem Falle zu erwarten, daß die Gesamtmasse

[1]) Fermentforschung 3, 8.

aller Substanzen des Reaktionsgemisches in Lösung verharrt. Bei der Präcipitation trifft das jedoch nicht zu, da das Eiweiß zum Teil ausflockt, wodurch die Refraktion selbstverständlich erniedrigt werden muß. Vom Standpunkte der Autoren, welche an einen fermentativen Antigenabbau denken, sind daher, wie Langenstrass auseinandersetzt, 3 Endresultate möglich:

1. Die Refraktionsvermehrung (Folge der fermentativen Spaltung) ist größer als die Verminderung (Folge der Ausfüllung des Präcipitates), dann erhält man eine Zunahme der Refraktion in der überstehenden Flüssigkeit gegenüber dem berechneten arithmetischen Mittel der IW. von Präcipitinogen und Präcipitin.

2. Die Refraktionsvermehrung ist gleich der Verminderung. Dann ist der Refraktionswert der überstehenden Flüssigkeit dem bezeichneten Mittel gleich, obwohl eine Substanzverarmung durch Absetzen des Niederschlages notwendigerweise erfolgt sein mußte.

3. Die Vermehrung ist kleiner als die durch Ausflockung bedingte Verminderung. Dann weist die überstehende Flüssigkeit im Vergleich zum arithmetischen Mittel der Reaktionskomponenten ein Refraktionsdefizit auf.

Die sub 1 und 2 bezeichneten Versuchsergebnisse wären direkt im Sinne von van Calcar sowie von Hirsch und Langenstrass verwertbar. P. Hirsch hat auch de facto derartige Beobachtungen gemacht, aber nicht oder nur ganz ausnahmsweise bei der Immunpräcipitation, sondern bei einer anderen, mit der Präcipitation nicht ohne weiteres identifizierbaren Versuchsanordnung, nämlich bei der spezifischen Ausflockung des Fickerschen Typhusdiagnostikums durch Typhusimmunserum. Doerr hat diese Angaben an anderer Stelle kritisch besprochen, so daß wir hier nicht näher darauf einzugehen brauchen. Es sei nur kurz betont, daß das Fickersche Diagnostikum verschiedene Stoffe (Carbolsäure usw.) enthält, welche mit dem zugesetzten Immunserum bzw. mit Bestandteilen desselben chemisch reagieren und dadurch den Refraktionswert des Gemenges völlig unabhängig von der Antigen-Antikörperreaktion modifizieren können. Es hätten somit zum mindesten Kontrollversuche mit Normalserum und mit einem heterologen Immunserum angesetzt werden müssen, was jedoch verabsäumt wurde. Abgesehen von dieser Fehler-

quelle, deren Nichtbeachtung jede Deutung der Resultate von vornherein ausschließt, fällt noch ins Gewicht, daß die normalerweise gehemmte Autoproteolyse verschiedener Sera durch Zusatz von Phenol in Gang gebracht werden kann (Yamakawa und Okubo).

Bei der Immunpräcipitation konstatierten Hirsch und Langenstrass meist nur solche Refraktionswerte der überstehenden Flüssigkeiten, die sich unter dem arithmetischen Mittel der Reaktionskomponenten hielten. Hier konnte der Beweis für die Fermenthypothese auf direktem Wege nicht mehr geführt werden. Wohl aber vermochten die Autoren eine indirekte Methode ausfindig zu machen, welche einen Schluß in dieser Richtung zuließ. Sie versuchten den Nachweis zu erbringen, daß die Verminderung der Refraktion der überstehenden Flüssigkeit geringer ist als man nach der Masse bzw. nach dem Refraktionswert des Präcipitates erwarten würde. Es handelte sich somit in technischer Hinsicht nur darum, den IW. des Präcipitates zu messen, eine Forderung, die P. Hirsch erfüllte, indem er die Präcipitate von der überstehenden Flüssigkeit absonderte, trocknete, mit destilliertem Wasser, Äther und Alkohol wusch und dieselben schließlich in einer Flüssigkeit von bekanntem IW., in $^{n}/_{10}$-NaOH, wieder auflöste. Die durch die Lösung des Präcipitates herbeigeführte Erhöhung des Refraktionswertes der NaOH gibt den Refraktionswert des Präcipitates an, und um diesen Betrag mußte sich eben der optische Wert der überstehenden Flüssigkeit vermindert haben, wenn bei der Präcipitation nur physikalische Vorgänge intervenieren würden; läuft eine Proteolyse ab, dann würde die Verminderung der Refraktion der überstehenden Flüssigkeit kleiner sein als der durch die Niederschlagsbildung involvierte Verlust an optischer Dichte. Hirsch und Langenstrass berichten über Erfahrungen, welche für die letztgenannte Alternative zu sprechen scheinen und die somit im Sinne der ganzen Fragestellung als Beweise für die Fermentnatur der Präcipitine zu gelten hätten. P. Hirsch und Langenstrass sprechen sich allerdings nicht an allen Stellen ihrer Publikationen mit der wünschenswerten Klarheit darüber aus, ob und in welchem Ausmaße sie durch ihre experimentellen Untersuchungen die Lehre von der Fermentnatur der Präcipitine als verifiziert erachten. Indes hat doch Langenstrass (l. c. S. 42)

ausdrücklich hervorgehoben, daß „eine reine Kolloidreaktion“ bei der Präcipitation „sicher nicht in Frage kommt“. Vielmehr scheint ihm festzustehen, daß spezifischen Kräften (Fermenten, Abwehrfermenten) die Hauptrolle zugeschrieben werden muß. Das Präcipitin wirkt nach seiner Ansicht „zunächst abbauend, und zwar spezifisch auf das Antigen. Dieser Vorgang ist ein rein chemischer. Später, „vielleicht oder wahrscheinlich auch nebenher, tritt nun die eigentliche Präcipitation auf“.

Zu dieser Hypothese und ihrer experimentellen Begründung durch Hirsch und Langenstrass hat der eine von uns (R. Doerr) bereits vor Jahresfrist Stellung genommen und über interferometrische Untersuchungen von 4 Immunpräcipitationen und verschiedenen aspezifischen Kolloidflockungen berichtet, welche ihn — abgesehen von anderen Erwägungen — zu einer entgegengesetzten Ansicht führten. Nach Doerr zeigt die interferometrische Analyse der Immunpräcipitation dieselben Verhältnisse wie die Flockung von Eiweißlösungen durch Thor- oder Cer-Salze, eine Sachlage, welche die Annahme fermentativer Abbauprozesse des Eiweißantigens zur Erklärung der Immunpräcipitation überflüssig macht.

Die von Doerr verwendeten Versuchsanordnungen gestatten aber keinen vollkommen exakten Vergleich der Immunpräcipitationen mit den als Pendants gewählten Kolloidmodellen; es können sowohl gegen die Methodik wie auch gegen die rechnungsmäßige Verwertung der interferometrischen Ablesungen Einwände erhoben werden, die allerdings an den mitgeteilten Resultaten wie an ihrer Interpretation nichts Wesentliches ändern würden. In Anbetracht der prinzipiellen Bedeutung des zur Diskussion stehenden Problems für die Auffassung der wichtigsten Immunitätsreaktionen (Präcipitation, Anaphylaxie, Agglutination) haben wir uns aber doch entschlossen, die Arbeiten fortzusetzen. Um alle Fehlerquellen zu vermeiden, war zunächst eine gründliche, auf eine breite Basis aufgebaute Voruntersuchung über die Anwendungsweise und Anwendungsmöglichkeit des interferometrischen Verfahrens notwendig, wenigstens in jenen Beziehungen, welche für die Fragestellung Bedeutung besaßen; vor allem war zu untersuchen, inwieweit aus Refraktionsänderungen Rückschlüsse auf die chemisch-fermentative Natur eines Vorganges gezogen werden dürfen. Dann aber galt

es, die tatsächliche Beeinflussung der Refraktion durch die Immunpräcipitation möglichst exakt festzustellen, exakter und in zahlreicheren Versuchen, als das in Doerrs erster Mitteilung der Fall war.

Wir konnten, wie die folgenden Ausführungen dartun werden, die von Doerr vertretene Auffassung, daß sich die Refraktion bei Immunpräcipitationen nicht anders verhält wie bei unspezifischen Eiweißflockungen durch anorganische Kolloide, durch weiteres Beweismaterial stützen. Darüber hinaus vermochten wir mit einer ganz einfachen neuen Versuchsanordnung (direkte Verfolgung des Präcipitationsvorganges im Interferometer) einwandfrei zu zeigen, daß in der ersten Phase der Präcipitation keine Refraktionsänderung eintritt. Nur diese erste Phase der Präcipitation, welche vom Vermengen des Präcipitinogens mit dem Präcipitin bis zum Beginne der Flockung reicht, kann aber für die Ursachen des spezifischen Fällungsprozesses in Betracht gezogen werden.

I. Voruntersuchungen.

Bevor wir an die erneute interferometrische Analyse der Immunpräcipitation herantraten, suchten wir uns durch eine größere Reihe von Vorarbeiten über die Leistungsfähigkeit des interferometrischen Verfahrens für die von uns ins Auge gefaßten Zwecke Gewißheit zu verschaffen. Wir studierten daher in erster Linie die Einzelheiten der Technik. Sodann wurden interferometrische Messungen vorgenommen, und zwar a) bei Gemengen von Flüssigkeiten ohne und mit wechselseitigen chemischen Affinitäten, b) bei rein kolloidalen Ausflockungen von Eiweißlösungen durch die Salze seltener Erden und c) bei echten Fermentationen. So gewannen wir eine Grundlage für die Beurteilung der Resultate der Hauptversuche, welche sich mit der spezifischen, durch Antigen-Antikörperreaktion bedingten Eiweißfällung beschäftigten.

1. Prinzip und Technik des interferometrischen Verfahrens.

Ihrem Wesen nach sind Messungen mit dem Interferometer (Interferenzrefraktometer) Refraktionsbestimmungen.

Die Refraktion ist eine physikalische (optische) Eigenschaft der Körper, wird aber durch ihre chemische Struktur entscheidend beeinflußt. Sie hängt daher ab: von der Zahl, der Art und den gegenseitigen

Beziehungen (Bindungen) der die Moleküle aufbauenden Atome. Daraus ergibt sich automatisch die doppelte Anwendung von Refraktionsbestimmungen; man kann sie benutzen, um zu Aussagen über die Konzentration eines Stoffes, z. B. einer Lösung von NaCl in destilliertem Wasser, zu gelangen, oder man kann sie zu Rückschlüssen auf die chemische Zusammensetzung der geprüften Stoffe verwenden. Da die Refraktion, besonders bei Flüssigkeiten, eine sehr exakt und relativ rasch meßbare Größe ist, zu deren Ermittlung man überdies nur kleine Flüssigkeitsmengen benötigt, haben sich die Methoden der Refraktionsbestimmung in den verschiedensten physikochemischen und medizinischen Arbeitsgebieten eingebürgert.

Apparate zur Refraktionsbestimmung. Ursprünglich wurde die Refraktion durch Messung des Grenzwinkels der totalen Reflexion (Glanzwinkel) ermittelt. Darauf beruhen die verschiedenen Refraktometermodelle (Abbee, Pulfrich), von welchen sich besonders das Pulfrichsche Eintauchrefraktometer in die medizinischen Laboratorien Eingang verschaffte. Das Bedürfnis nach einer weiteren Steigerung der Empfindlichkeit führte in der Folge zur Anwendung des Prinzips der Ablenkung des Interferenzspektrums der zu prüfenden Lösung bzw. des zu untersuchenden Gases gegenüber dem Spektrum eines Vergleichsmediums. Die ersten nach diesem Prinzip konstruierten Apparate stammten von Jamin, Michelson und Lord Rayleigh. In Deutschland gab Loewe dem Rayleighschen Apparat im Laboratorium der Firma Zeiß eine andere, die praktische Brauchbarkeit erhöhende Form und stellte 2 Typen her, welche verschiedenen Zwecken dienen und von welchen die eine als Gasinterferometer, die andere als Flüssigkeitsinterferometer bezeichnet wird. Mit dem letztgenannten Apparat wurden die optischen Untersuchungen über die Immunpräcipitation angestellt, sowohl die von Hirsch, Langenstrass und Doerr, als auch die Experimente, welche den Inhalt der vorliegenden Mitteilung bilden. Barus in Amerika benutzt seit 1911 für physikalische Studien ein von ihm selbst konstruiertes Instrumentarium, welches er nach dem zugrunde gelegten Meßprinzip ebenfalls Interferometer nennt, das aber wesentlich von dem Loeweschen Flüssigkeitsinterferometer abweicht.

Hinsichtlich der Technik der interferometrischen Untersuchung verweisen wir im allgemeinen auf die in den Publikationen von Loewe, Marc, Hirsch, Schmeel und Langenstrass niedergelegten Gebrauchsanweisungen und Erfahrungen. Wir wollen hier auf methodologische Details nur so weit eingehen, als wir das für die Bewertung unserer Versuchsergebnisse für nötig erachten.

Daß man bei einer verhältnismäßig recht empfindlichen Methode Fehlerquellen zu berücksichtigen hat, ist wie bei allen feineren Messungen von vornherein zu erwarten. Die Exakt-

heit der interferometrischen Untersuchungen beruht auf der Richtigkeit und Genauigkeit der optischen Messung einerseits und auf der Zuverlässigkeit der Abmessung und der Erhaltung der Reaktionsvolumina andererseits. Nach beiden Richtungen muß die Größe, die Häufigkeit und die Vermeidbarkeit der möglichen Fehler bekannt sein und bei der Deutung der gewonnenen Resultate beachtet werden.

Um die vielen vermeidbaren Fehler auszuschalten, hielten wir uns streng an die von den genannten Autoren mitgeteilten Vorschriften und Ratschläge, von deren Richtigkeit und Notwendigkeit wir uns im großen ganzen selbst überzeugen konnten. So verwendeten wir zur Verbesserung der Ablesung helles, nicht zu grelles Licht (Anschluß der Lämpchen an die Lichtleitung unter Vorschaltung eines von der Firma Zeiß gelieferten Widerstandes) und dämpften die Beleuchtung des Laboratoriums stark ab, wodurch sich die Empfindlichkeit des beobachtenden Auges für feine Differenzen wesentlich erhöht.

Zur Auswahl (Einstellung) des richtigen Streifenpaares bedienten wir uns der angegebenen Kautelen und Kunstgriffe (richtige, zentrale Augenhaltung, Bewegung des Auges vor dem Okular, Drehung des Okulars, Dunkeladaptation usw.). Die Ablesungen wurden erst nach vollzogenem Temperaturausgleich vorgenommen; jede Einzelmessung gründete sich ausnahmslos auf das Ergebnis wiederholter Ablesungen mit eingeschaltetem Umschütteln des Kammerinhaltes. Untersuchungen mit höher konzentrierten, heterologen Lösungen wurden konform den Forderungen von Langenstrass bei einer während des ganzen Experimentes konstanten Temperatur durchgeführt.

Vor allem aber haben wir uns bemüht, die zu messenden Lösungen und die Vergleichsflüssigkeiten so einzustellen, daß die abgelesenen Interferometerwerte (IW.) auch bei Verwendung der 4 cm-Kammer um 1500 Trommelteilen (TT.), durchschnittlich sogar unter 1200 TT. lagen, wodurch sie aus dem korrekturbedürftigen Bereich in das nichtkorrekturbedürftige gerückt wurden. (Die Aichkurve, die wir für unser Instrument mit Kochsalzlösungen anlegten, zeigte Abweichungen der abgelesenen von den berechneten Werten von 1300 TT. angefangen.)

Die Nullage (Einstellung bei Füllung beider Kammerhälften mit der gleichen Flüssigkeit) wurde bei jedem Versuche neu ermittelt, obwohl sie ziemlich konstant mit 25 (±0,5) TT. bestimmt werden konnte. Auf die Vermeidung der Verdunstung der Versuchsflüssigkeiten innerhalb und außerhalb der Kammern sowie auf die Hintanhaltung von bakteriellen und anderweitigen Verunreinigungen, endlich auf die Ausschaltung von Fehlern beim Pipettieren wurde selbstverständlich großes Gewicht gelegt.

Trotz strenger Befolgung dieser Vorschriften haften jedoch dem Verfahren noch einige weitere, nicht oder wenigstens nicht immer vermeidbare Fehler an, so daß bei der Deutung der Befunde mit einer gewissen, noch zu fixierenden Fehlerbreite zu rechnen ist. Die hauptsächlichsten unvermeidbaren Fehler sind:

a) der Ablesungsfehler,
b) die unvermeidlichen Fehler beim volumetrischen Arbeiten,
c) die Streifenverwechslung.

Die beiden erstgenannten Fehler können im Verhältnis zur Empfindlichkeit des Apparates als gering taxiert werden.

Der Ablesungsfehler kommt gegenüber dem Einfluß anderer Fehler fast gar nicht in Betracht; wir bemessen ihn gleich Schmeel auf ± 1 TT.

Auch die Fehler beim volumetrischen Arbeiten involvieren keine bedeutenden Fehlausschläge und werden naturgemäß sehr eingeschränkt, wenn die Refraktionen der in einem Versuche verwendeten Flüssigkeiten nicht sehr erheblich differieren. Mischt man z. B. 2 Lösungen, deren IW. nicht stark voneinander verschieden sind, zu gleichen Teilen, so wird eine Ungenauigkeit in der Volumsabmessung den optischen Wert des Gemenges nur wenig beeinflussen, während sich ein Fehler gleichen Grades beim Vermengen von destilliertem Wasser mit 5% Kochsalzlösung sehr unangenehm bemerkbar machen würde. Wir haben nun — wie erwähnt — bei jedem einzelnen Versuch stets nur Flüssigkeiten benutzt, deren IW. in einem Meßintervall von 1400 TT. lagen; dadurch fielen nicht nur die mißlichen Korrekturen weg, sondern es wurde der volumetrische Fehler einem unvermeidlichen Minimum angenähert.

Über die effektive Größe der sub 2 genannten Fehler verschafften wir uns in doppelter Weise Kenntnis: einmal durch Auswägen des Pipetteninhaltes, dann aber auch in der Weise, daß wir mehrere Proben eines Gemisches herstellten und jede von ihnen in der 4 cm- und in der 2 cm-Kammer ausmaßen. Nach diesem Schema wurde der nachstehende Versuch angestellt, welcher 3 Gemenge von 0,03% mit 0,3 proz. Kochsalzlösung zu gleichen Teilen betrifft:

	IW. (4 cm-Kammer)	Mittlerer Fehler	Differenz gegen den berechn. Wert
Gemenge a)	892	+1	−7
„ b)	893	+2	−6
„ c)	888	−3	−11

	IW. (2 cm-Kammer)	Mittlerer Fehler	Differenz gegen den berechn. Wert
Gemenge a)	460	+0,7	+5
„ b)	460	+0,7	+5
„ c)	458	−1,3	+3

Auf Grund unserer Erfahrungen beziffern wir den aus unvermeidlichen volumetrischen Fehlern hervorgehenden mittleren Messungsfehler mit ± 5 TT. — Bei sehr ungünstigen gegenseitigen Volums- und Konzentrationsverhältnissen der miteinander zu mischenden Flüssigkeiten kann er höhere Werte annehmen; unter den Bedingungen, die bei unseren Experimenten gegeben waren, sehen wir aber, daß die Genauigkeit der Volumsabmessungen der Genauigkeit der interferometrischen Refraktionsbestimmung so ziemlich entspricht.

Der wichtigste, weil größte der unvermeidlichen Fehler ist die Streifenverwechslung; man stellt ein falsches Streifenpaar über das Minimum nullter Ordnung des fixen Spektrums. Wir pflichten in dieser Beziehung Loewe, Hirsch und Langenstrass insofern bei, als auch wir die Erfahrung gemacht haben, daß die Einstellung des richtigen Streifenpaares bei entsprechender Übung und Sorgfalt in der Regel gelingt. Bei größeren Wertungsreihen mußten wir aber wiederholt konstatieren, daß die eine oder die andere Ablesung offenbar um ein Streifenpaar zu hoch oder zu niedrig ausgefallen war[1]), oder daß die Entscheidung, welches von 2 benachbarten Streifenpaaren das richtige ist, nicht mit Sicherheit gefällt werden konnte. Diesen Schwierigkeiten bei der Auswahl des richtigen Streifenpaares sind nicht wir allein begegnet; sonst hätten sich wohl nicht fast alle Autoren, die über die Verwendung des Interferometers berichteten, so ausführlich mit diesem Problem beschäftigt.

Marc hat 1911 die Ursache dieser Schwierigkeiten systematisch untersucht. Er prüfte kolloidale Lösungen (Gelatine, Eiweiß) und ermittelte zunächst eine Ausgangskonzentration, bei welcher eine Einstellung mit völlig identischem oberen und unteren Streifenpaar möglich war. Wurde nun die Konzentration des Hydrosols sukzessive erhöht, so gelang es alsbald nicht mehr, im oberen Interferenzband ein Streifenpaar zu ermitteln, welches mit dem unteren feststehenden Streifenpaar völlig identisch war. Es zeigte sich folgende Erscheinung. Bei der Versuchsanordnung von

[1]) Solche Irrtümer wird man gewahr, wenn man einen und denselben Versuch doppelt ansetzt und durchführt oder wenn man bei einem Versuch alle Abmessungen in 2 Kammern (4 cm und 2 cm) vornimmt. Es kann sich dann ereignen, daß im ersten Falle eine Messung offenkundig gerade um eine Streifenbreite (etwa 20 TT.) aus der Reihe der anderen Ablesungen herausspringt, oder daß im zweiten Falle die Ablesung in der einen Kammer nicht dem mit der anderen Kammer gewonnenen Wert entspricht, sondern ebenfalls um eine Streifenbreite abweicht.

Marc ist die Konzentration der untersuchten Proben jeweils bekannt; man kennt daher im voraus den jeder Konzentration entsprechenden IW., daher natürlich auch das „richtige" Streifenpaar. Dieses wird aber — wie gesagt — mit steigender Konzentration dem unteren immer unähnlicher, während gleichzeitig das nächsthöhere Streifenpaar immer ähnlicher wird, bis man schließlich zu einer Konzentration kommt, bei welcher nicht das „richtige", sondern das nächsthöhere Streifenpaar mit dem unteren Streifenpaar identisch ist. Wäre diese Konzentration unbekannt, so müßte der Beobachter notwendigerweise um eine Streifenbreite zu hoch einstellen und dementsprechend auch die Konzentration der Lösung zu hoch veranschlagen.

Steigert man die Konzentration des Kolloids noch weiter, so wiederholt sich dieses Spiel von neuem. Die Länge dieser Perioden ist für verschiedene Stoffe verschieden; für Albumin beträgt sie z. B. 270 TT. (in der 2 cm-Kammer). Mehr als 2 Perioden mußte Marc in dem üblichen Meßintervall in keinem Falle berücksichtigen. Entsprechend dem sprungweisen Vorrücken der Einstellung um ein Streifenpaar erhält man beim Anlegen von Eichkurven für kolloide Lösungen Linien mit Knicken; das Intervall zwischen 2 Knicken begrenzt immer eine Periode des geschilderten Streifenwechsels. Kristalloide Lösungen zeigen diese Erscheinung nicht, wenigstens nicht bei niederen Konzentrationen; bei Hydrosolen dagegen und bei Messungen, die sich in einem großen Intervall bewegen, muß sie zur Geltung kommen und repräsentiert dann eine Quelle recht beträchtlicher Fehler. Man sucht daher nach dem Vorgange von Marc für kolloidale Flüssigkeiten Eichkurven anzufertigen, welche es gestatten, die Unstetigkeiten in Rechnung zu setzen. Leider ist das jedoch nicht immer möglich, wie z. B. bei Versuchen mit ausflockenden Gemischen von Serum und Antiserum, und dann bleibt eben nichts anderes übrig, als bei den Resultaten einen möglichen Irrtum um eine Streifenbreite (bei unserem Apparat um 20 TT.) in Kauf zu nehmen resp. bei der Deutung der Resultate zu berücksichtigen. Gans und Bose sehen die Ursache der Marcschen Sprünge in der verschiedenen Dispersion zwischen dem Kolloid (und zwar der Substanz selbst, nicht ihrer Lösung) auf der einen Seite der Kammer und zwischen dem Kompensator auf der anderen Seite.

Schmeel meint bezüglich des Einstellens, daß es sich oft nur um das Aufsuchen einer „Optimalstellung" handle und daß die Schwierigkeiten der Einstellung besonders groß werden, wenn zwischen den an einer bestimmten Lösung vorgenommenen Ablesungen Messungen anderer Flüssigkeiten ausgeführt werden, ein Vorgang, den aber gerade unsere Versuchsanordnung erfordert.

P. Hirsch hat zwar anläßlich seiner ersten Bemühungen, die interferometrische Methode in die Technik der Abwehrfermentstudien einzuführen, von einer „Nullmethode" gesprochen, „die erfahrungsgemäß bei den verschiedenen Beobachtern durch Ausschaltung aller subjektiven Beobachtungsfehler zu gleichmäßigen und genauen Resultaten führt". Er hat aber in der Folge mit seinem Mitarbeiter Langenstrass die Vorschriften über

die Streifenwahl selbst teilweise geändert und zugegeben, daß es schließlich darauf hinauskommt, „daß sich jeder Beobachter in einer Reihe von Vorversuchen diejenige Methode aussucht, mit der er die besten Ergebnisse erzielt“.

Wir haben der Reihe nach alle Vorschriften für die Streifenwahl (Loewe, Marc, P. Hirsch, Schmeel, Langenstrass) erprobt. In manchen Fällen lassen alle im Stich. Gut bewährte sich das Aufsuchen der optimalen Nullstellung für eine bestimmte Art von Lösungen und das Festhalten an der hierbei ermittelten, durch die Farbsäume der Streifen charakterisierten Streifenstellung bei allen weiteren Messungen desselben Experimentes. Von größter Wichtigkeit erscheint uns ferner die Forderung nach streng zentraler Augenhaltung; die einzustellenden Streifenpaare sollen genau in die Mitte des dunklen, kreisförmigen Gesichtsfeldes zu liegen kommen. Das Anbringen einer Visiervorrichtung, etwa eines Fadenkreuzes zwischen Okular und Spektrum ist leider nicht möglich, weil eine Zylinderlinse als Okular dient (Haber u. Loewe).

Nicht selten ist man bei fraglichen Einstellungen darauf angewiesen, jene Einstellung zu wählen, welche dem bei einer anderen Kammerlänge erhaltenen Wert oder anderen Messungen, die man zur Kontrolle heranzuziehen berechtigt ist, besser entspricht. Daher erscheint es eben sehr ratsam, die Aufdeckung und Korrektur derartiger Fehler durch die Anordnung der Versuche a priori zu ermöglichen, indem man die Experimente doppelt oder dreifach ansetzt und sämtliche Flüssigkeiten jedes Versuches in 2 Kammern von verschiedener Länge (4 und 2 cm oder 2 und 0,5 cm) ausmißt. Die Versuche, die ohnehin schon ganz beträchtliche Anforderungen an peinlich sauberes und gewissenhaftes Arbeiten stellen, werden dadurch natürlich nicht leichter und einfacher, wohl aber viel verläßlicher und überzeugender.

Die IW., welche sich für eine Flüssigkeit bei einfacher und doppelter Länge der Kammer ergeben, verhalten sich theoretisch genau wie 1 : 2; in praxi sind kleine Schwankungen bis zu $\pm$ 5 TT. häufig. Nähert sich aber die Differenz einer Streifenbreite, so deutet das auf Fehler in der Streifenwahl. Bisweilen begegnet man allerdings auch Differenzen, die eine halbe Streifenbreite betragen. Es darf daher auch nicht überraschen, wenn die in der 2 cm- und in der 4 cm-Kammer gewonnenen Endresultate eines komplizierten, von vielen Messungen abhängigen Versuches nicht immer genau den Quotienten 2 ergeben.

Im Hinblicke auf die von P. Hirsch zuerst angewendete und von uns modifizierte Methodik der Analyse von Eiweißfällungen müssen wir also nachdrücklichst darauf aufmerksam machen, daß mit kolloidalen Lösungen keine so exakten Ablesungen und somit auch keine so eindeutigen Versuchsergebnisse zu erzielen sind wie mit Lösungen von Kristalloiden; das gilt schon für den Fall, daß man nur mit einem einzigen, bloß der Konzentration nach variierten Hydrosol arbeitet, in weit höherem Ausmaße jedoch, wenn mehrere, verschieden zusammengesetzte Kolloidlösungen gemessen werden müssen und das Endresultat beeinflussen. Den vorstehenden Ausführungen zufolge sollten eben für jedes einzelne Hydrosol besondere Eichkurven nach Marc angelegt werden. Das ist jedoch bei der von Hirsch benutzten Technik zum Studium der Immunpräcipitation nicht realisierbar, zum mindesten nicht für das Gemisch von Präcipitinogen und Präcipitin. Eine weitere Erschwerung der Messung liegt in der mehr weniger rötlichen Eigenfarbe mancher leicht hämolytischen Sera. Unter diesen Umständen muß man mitunter auch erheblichere Fehler erhalten, als sie durch die fehlerhafte Ablesung und die unvermeidlichen Ungenauigkeiten der Volumetrie bedingt sind. Eine Streifenverwechslung beim Ausmessen der Präcipitatlösung wird z. B. im Endresultat einen Fehler von rund 20 TT. zur Folge haben; Fehlablesungen bei Bestimmung der Ausgangslösungen erscheinen wieder in dem daraus berechneten Sollwert der Mischung von Antigen und Immunserum und können durch die vielen Rechenoperationen, welche das Verfahren von Hirsch erfordert, sowohl eine Vergrößerung als auch eine Verkleinerung erfahren. Überhaupt liegt eine Schwäche der von Hirsch angegebenen Methodik darin, daß der IW. des Gemisches von Antigen und präcipitierendem Antiserum nur berechnet und nicht direkt gemessen wird. Wir werden zeigen, wie man diesem Übelstande abzuhelfen vermag.

2. Das Verhalten der Refraktion beim Mischen von Flüssigkeiten, die miteinander nicht reagieren.

Wenn beim Vermengen von mischbaren Flüssigkeiten Temperaturschwankungen, chemische Umsetzungen und solche Volumsveränderungen, welche von der einfachen Addition der

vermengten Volumina abweichen, nicht stattfinden, sind die Beziehungen des Refraktionswertes des Gemenges zu den Refraktionswerten seiner Komponenten relativ einfach. Die Refraktion verhält sich dann rein additiv (Lorentz - Lorenz, Gladstone, Landolt, Brühl u. a.) und das optische Ergebnis des Mischungsvorganges läßt sich im voraus mit einer praktisch ausreichenden Annäherung an den direkt feststellbaren Wert berechnen. Da die Refraktion einer Flüssigkeit bei konstanter Temperatur und innerhalb gewisser Grenzen der Konzentration direkt proportional ist (Quincke, Robertson, Wintgen u. a.), können wir uns bei der Berechnung des Refraktionswertes eines Gemenges der bezeichneten Art der allgemein gebräuchlichen Mischungsformel bedienen, die in Anwendung auf den vorliegenden Fall folgende Gestalt annimmt:

$$IW_x = \frac{IW_1 \cdot v_1 + IW_2 \cdot v_2 + \ldots}{v_1 + v_2 + \ldots} \,. \qquad (1)$$

Allgemeine Mischungsformel

IW_1 und IW_2 bedeuten die Interferometerwerte der vermischten Flüssigkeiten, IW_x den Interferometerwert des Gemisches und v_1, v_2, v_x die zugehörigen Volumina. In dieser allgemeinen Fassung kann die Formel auf Mischungen in beliebigen Proportionen angewendet werden. Die Diskussion der Formel lehrt, daß man mit ihrer Hilfe berechnen kann:

a) die Refraktion eines Gemenges, wenn die Komponenten (nach Refraktion und Volumen) bekannt sind;

b) die Refraktion einer Komponente und

c) das Volumen des Gemenges oder einer Komponente, falls alle übrigen Werte ziffernmäßig feststehen.

Von den beiden erstgenannten Möglichkeiten werden wir bei unseren Versuchen Gebrauch machen.

In dem sehr häufigen Spezialfall des Vermengens gleicher Volumina von 2 miteinander nichtreagierenden Flüssigkeiten reduziert sich die allgemeine Mischungsformel auf die (auch von P. Hirsch benutzte) Gleichung:

$$IW_x = \frac{IW_1 + IW_2}{2} \,. \qquad (2)$$

Schließlich läßt sich die Formel auch auf die bloße Verdünnung mit destilliertem Wasser anwenden, wobei IW_2 gleich

Null wird und die Formel eine weitere Vereinfachung erfährt. Für die n-fache Verdünnung lautet sie dann:

$$IW_x = \frac{IW_1}{n}. \qquad (3)$$

Verdünnungsformel

Sie drückt jetzt einfach die Tatsache aus, welche den Ausgangspunkt der ganzen Betrachtung bildet, daß nämlich die Refraktion mit der Änderung der Konzentration eines gelösten Stoffes steigt und fällt, daß also z. B. der doppelten Konzentration einer wässerigen Lösung ein doppelter Refraktionswert entspricht.

Von der Anwendbarkeit der allgemeinen Mischungsformel (1) kann man sich überzeugen, indem man verschiedene Volumina von Kochsalzlösungen verschiedener Refraktion vermengt und den beobachteten Wert des Gemisches mit seinem berechneten Sollwert vergleicht. Die Übereinstimmung ist eine ganz bemerkenswerte, wenn man bedenkt, wie sehr die Komponenten des Gemenges nach Volum und Refraktion differieren:

Versuch.

1 ccm 2 proz. NaCl + 19 ccm 0,27 proz. NaCl werden gemengt.

	IW (4 cm - Kammer)	
2 proz. NaCl	10,920	(berechnet als 20fache Verdünnung einer 0,2 proz. Lös.!)
0,27 proz. NaCl	1492	
Gemenge beobachtet, Probe a)	1963	
Gemenge beobachtet, Probe b)	1964	
Gemenge berechnet, $IW_x = \frac{10.920 + 1492,19}{20} =$	1963	
Differenz (berechn. — beob. Wert) a)	0	
b)	—1.	

Aus einer größeren Anzahl solcher Mischungsversuche mit indifferenten Flüssigkeiten läßt sich dann der durchschnittliche Fehler dieser Versuchsanordnung bestimmen. Wir führen zunächst noch einige Beispiele von Mischungen nichtreagierender Flüssigkeitspaare an, beschränken uns jedoch auf die Wiedergabe der Differenz zwischen beobachtetem und berechnetem Wert, wobei das negative Vorzeichen besagt, daß der beobachtete Wert kleiner gefunden wurde als er der Rechnung nach hätte sein sollen.

Gemischte Flüssigkeiten:	Differenz in der 2 cm-Kammer	Differenz in der 0,5 cm-Kammer
Kochsalzlösung + dest. Wasser . . .	−7	+10
„ + Kochsalzlösung . .	−1,3	+1
verd. NaOH + „ . .	−6,5	+9
verd. Pferdeserum + Kochsalzlösung .	−6	−10
Thornitratlösung + „ .	−5	−9
„ + dest. Wasser . .	−7	—
„ + Cerchlorürlösung	−11	−6

Eine absolute Identität der berechneten mit den beobachteten Werten läßt sich daher nicht erzielen, nicht einmal beim Verdünnen einer Salzlösung mit destilliertem Wasser, obwohl hier chemische Umsetzungen gewiß nicht in Frage kommen. Man könnte höchstens bei sehr starken Verdünnungen an einen Einfluß der zunehmenden Dissoziation denken. Dissoziationen könnten jedoch nur in dem Falle Abweichungen von der Verdünnungsregel bedingen, daß die Summe der Ionenrefraktionen nicht gleich der spezifischen Molekularrefraktion ist, daß also durch die Dissoziation chemische Bindungen aufgehoben werden, welche für die Refraktion des Gesamtmoleküls in Betracht kommen. Wir können auf dieses Problem nicht weiter eingehen und wollen nur bemerken, daß bei stärkeren Kochsalzverdünnungen ein Einfluß der Dissoziation nicht zu konstatieren war. Die Dissoziation müßte sich in einer Reihe steigender Verdünnungen höheren Grades immer stärker bemerkbar machen, was aber nicht zutrifft. Vielmehr entsprechen die Werte — von den irregulären kleinen Schwankungen abgesehen — der Verdünnungsregel.

Konzentration der NaCl-Lösung	IW. (4 cm-Kammer)	IW. (2 cm-Kammer)
0,02%	102	51
0,01%	50	26
0,005%	25	14

Wir ziehen aus diesen und den schon früher besprochenen Versuchen mit Parallelproben den Schluß, daß die beim Vermengen von nichtreagierenden Flüssigkeiten erhaltenen Endrefraktionen der Gemenge mit großer Annäherung nach der angegebenen Formel berechnet werden können; der mittlere Fehler beträgt für diese Versuchsanordnung ± 10 TT. für die 2 cm- und für die 0,5 cm-Kammer.

3. Das Verhalten der Refraktion beim Vermengen von Flüssigkeiten, die miteinander reagieren.

Die Refraktion hängt — wie bereits auseinandergesetzt wurde — nicht nur von der Zahl der Moleküle, sondern auch von der chemischen Zusammensetzung derselben ab.

Jedem Atom kommt eine ihm eigene, spezifische Refraktion (Atomrefraktion) zu. Die spezifische Molekularrefraktion entspricht gewöhnlich der Summe der Atomrefraktionen; bei manchen Molekülen jedoch (besonders bei C-, O- und N-Verbindungen) erhöht sich die Summe der Atomrefraktionen um bestimmte Werte, welche von gewissen Bindungen der Atome abhängen („optisch aktive Bindungen"), eine Tatsache, die schon mit Erfolg zur Erforschung unbekannter chemischer Konstitutionen benutzt wurde, z. B. von F. Pregl in seinen Untersuchungen über Abkömmlinge der Gallensäuren. Auf Grund dieser Abhängigkeit der Refraktion von der chemischen Struktur müssen wir bei Mischungen von Flüssigkeiten, die von chemischen Umsetzungen begleitet sind, 3 Eventualitäten berücksichtigen:

a) Das Gleichbleiben der Refraktion, wenn durch die chemischen Umsetzungen keine optisch aktiven Bindungen tangiert werden und wenn bei den Umsetzungen kein Wasser austritt.

b) Die Erhöhung der Refraktion, wenn neue optisch aktive Bindungen zustande kommen oder wenn Wasser zerlegt wird und dessen Ionen H und OH in andere Verbindungen eintreten. Der Hydroxyl-O hat z. B. eine andere Refraktion als der O in anderer Verkettung, z. B. in Carboxylgruppen.

c) Die Verringerung der Refraktion, wenn optisch aktive Bindungen aufgehoben werden oder wenn Wasser austritt und sich in Lösungsmittel verwandelt.

Das Freiwerden von Wasser spielt bei der Differenzmessung der Refraktion, wie sie im Interferometer vorgenommen wird — abgesehen von der verschiedenen Wertigkeit des O je nach der Art seiner Bindung — noch eine besondere Rolle. Die H- und O-Atome des freiwerdenden Wassers beteiligen sich, solange sie an andere Atome gebunden sind, mit ihrer spezifischen Atomrefraktion an der Refraktion des Gemenges; zu destilliertem Wasser vereinigt kommen sie dagegen für das Meßergebnis gar nicht in Betracht, da ja die Refraktion der in destilliertem Wasser gelösten Stoffe gegen destilliertes Wasser als Vergleichsflüssigkeit gemessen wird.

Während einfache Konzentrationsänderungen mit Hilfe der Refraktion auch quantitativ leicht zu untersuchen sind, liegen die Verhältnisse bei chemischen Reaktionen, speziell bei unvollkommen verlaufenden und reversiblen Prozessen weit ungünstiger und gestatten nicht ohne weiteres eine quantitative Analyse. Einen chemischen Vorgang kann man mit dem Interferometer nur dann messend verfolgen, wenn sich bloß wenige Komponenten

des Reaktionsgemisches ändern und wenn man außerdem sowohl die Endprodukte der Reaktion als auch die Reste der Ausgangsstoffe nach Menge, chemischer Konstitution und spezifischer Refraktion genau kennt. Wenn mehrere Reaktionen nebeneinander verlaufen, stellt die Refraktionsbestimmung stets nur ein indirektes, von sehr vielen Voraussetzungen abhängiges quantitatives Verfahren dar.

Eine so vollkommene Einsicht in das chemische Geschehen, wie sie hier gefordert werden muß, besitzen wir nun wohl bei zahlreichen chemischen, aber nur ausnahmsweise bei den sogenannten biologischen Reaktionen. Für letztere bleibt daher die refraktometrische Untersuchungsmethode ein vorwiegend qualitatives Verfahren, d. h. man sucht einfach festzustellen, ob sich bei einem bestimmten Vorgang überhaupt eine Refraktionsänderung vollzieht. Bei manchen ihrem Wesen nach vollständig ungeklärten Prozessen, wie z. B. bei den Immunitätsreaktionen, könnte eine derartige rein qualitative Methodik immerhin einen Forschritt insofern bedeuten, als die Refraktionsänderung unter Umständen der einzige Indicator sein kann, der eine Änderung der molekularen Zusammensetzung überhaupt nachweisbar macht. Auf Grund der soeben erörterten Beziehungen zwischen Refraktion und chemischem Geschehen darf man allerdings bei solchen Versuchen nur von einem positiven Befund, d. h. von einer Refraktionsänderung einen Aufschluß erwarten. Ein negatives Resultat d. h. das Gleichbleiben der Refraktion sagt nur aus, daß die Gesamtzahl der Atome dieselbe geblieben ist und daß etwaige optisch aktive Bindungen intakt erhalten wurden; dabei können jedoch große Moleküle in ihre Bausteine zerlegt worden sein oder es braucht sich ebensogut gar kein chemischer Vorgang abgespielt zu haben.

Die Richtigkeit dieser für das Verständnis unserer Untersuchungen notwendigen Überlegungen sei durch interferometrische Analysen einer einfachen chemischen Reaktion und einiger fermentativer Prozesse illustriert.

Versuch: Salzbildung mit Änderung (Verringerung) der Refraktion gegenüber dem berechneten Sollwert des Gemenges. Entstehung von Kochsalz aus Salzsäure und Natronlauge. Interferometerwerte in der 4 cm-Kammer gemessen mit destilliertem Wasser als Vergleichsflüssigkeit.

1. $^n/_{100}$-Salzsäure	263	TT.
2. $^n/_{100}$-Natronlauge	380	„
3. 1. + 2. $\bar{aa}$ berechnet nach der Mischungsformel	311	„
4. 1. + 2. $\bar{aa}$ beobachtet	164	„
5. **Differenz zwischen beobachtetem und berechnetem Wert**	**−147**	„
6. $^n/_{200}$-Natriumchlorid	163	„
7. **Differenz zwischen 4. und 6.**	+1	„

Wäre nur bekannt, was bei der Vereinigung von HCl und NaOH im allgemeinen vor sich geht, so bliebe es uns ganz unverständlich, warum der beobachtete Wert (164 TT.) um so viel niedriger ausfällt als der nach der Berechnung zu erwartende (311 TT.). Trotz der hohen Verdünnungen und der entsprechend niedrigen IW. gegen destilliertes Wasser stoßen wir auf die große Differenz von −147 TT., die aber genau der Berechnung entspricht, wenn der in diesem Falle bekannte chemische Vorgang zugrunde gelegt wird:

$$^n/_{100}\text{-NaOH} + {}^n/_{100}\text{-HCl} = {}^n/_{200}\text{-NaCl} + H_2O.$$

$^n/_{200}$-NaCl = 0,029% NaCl und für diese Konzentration liefert die direkte Messung in der 4 cm-Kammer den IW. von 163 T.T., welcher mit dem beobachteten Wert übereinstimmt. Der Wasseraustritt hat zu dieser erheblichen Refraktionsabnahme gegenüber dem bei einfacher Mischung zu erwartendem IW. geführt.

4. Das Verhalten der Refraktion bei fermentativen Reaktionen.

Die ersten Untersuchungen auf diesem Gebiete wurden im Jahre 1906 von Obermayer und E. P. Pick angestellt. Sie arbeiteten mit einem Pulfrichschen Refraktometer (Neukonstruktion 1895) und ordneten die Fermentwirkungen in 3 Gruppen; in die erste Gruppe gehörten jene, bei denen der Refraktionswert zunimmt (Beispiel: Trypsinfunktion), in die zweite jene, bei welchen er gleichbleibt (Pepsin), und in die dritte solche, bei denen er abnimmt (einige bakterielle Fermente). Die 3 Möglichkeiten der Refraktionsbeeinflussung durch chemische Reaktionen, die wir auf Grund der Kenntnisse über das Wesen der Refraktion theoretisch abgeleitet haben, kommen somit in der Natur bei den enzymatischen Prozessen de facto vor.

Um uns über die Größe und Geschwindigkeit enzymatisch bedingter Refraktionsänderungen ein Urteil zu bilden, haben wir die Wirkungen bekannter Fermente in den Bereich unserer Voruntersuchungen gezogen. Wir wählten mit Rücksicht auf unsere speziellen Zwecke:

a) eine Fermentation, bei welcher (mit Ausnahme der Fermentlösung) Ausgangs- und Endprodukte bekannte, chemisch definierte Körper sind;

b) eine Wirkung eines Serumfermentes (der Lipase des frischen Meerschweinchenserums);

c) ein klassisches proteolytisches Verdauungsferment (Trypsin).

Bei allen der 3 genannten Fermente läßt sich der Reaktionsablauf auch noch mit anderen Methoden verfolgen, wodurch eine entsprechende Kontrolle ermöglicht war.

ad a). Urease ist ein in zahlreichen Bakterien und auch in höheren Pflanzen vorkommendes Ferment, welches vom Zelleib abgesondert werden kann und das Harnstoff in Ammoniak und CO_2 zerlegt (Oppenheimer), CO_2 und NH_3 treten jedoch offenbar sofort wieder zu Ammoniumcarbonat zusammen, denn es läßt sich weder ein Entweichen von CO_2 (im Gärungskölbchen) noch von NH_3 (durch den Geruch) feststellen; ferner nimmt die Refraktion eines Gemenges von Urease und Harnstoff nach vollzogener Spaltung selbst bei offener Aufbewahrung nicht ab, was bei einem Gehalt an flüchtigen Stoffen der Fall sein müßte. Das Temperaturoptimum der Ureasefunktion liegt bei 50° C; jedoch geht die Spaltung des Harnstoffs auch bei Zimmertemperatur sehr rasch vor sich. Von einer wirksamen Ureaselösung wird verlangt, daß in 15 Minuten der ganze N als Ammoniak nachgewiesen werden kann. Wir verwendeten $^n/_{10}$-Harnstofflösungen und durch Zentrifugieren geklärte Fermentlösungen, die wir der Freundlichkeit des Herrn Prof. W. Löffler (Med. Klinik, Basel) verdankten und deren Brauchbarkeit jedesmal durch den Ammoniaknachweis sichergestellt worden war. Bestimmend für die Wahl „Urease-Harnstoff" war neben der genaueren Einsicht in die Chemie der Fermentation die rasche Wirksamkeit, da bei der Präcipitation sowohl als namentlich bei der Anaphylaxie — wenn überhaupt — nur sehr rasch wirkende Enzyme als ursächliche Momente in Betracht gezogen werden dürfen.

Zur refraktometrischen Verfolgung der Ureasewirkung, die beim Vermischen mit einer Harnstofflösung momentan und mit maximaler Intensität einsetzt, eignet sich das Interferometer besonders, da es eine relativ kurze Zeit für den Temperaturausgleich erfordert und außerdem auch große, von Minute zu Minute bequem ablesbare Ausschläge liefert.

Versuch: Die zu verwendenden Harnstoff- und Ureaselösungen wurden zunächst interferometrisch ausgemessen und sodann auf die Temperatur des Interferometerwasserbades vorgewärmt. Dann wurden sie

zu gleichen Teilen in ein Gefäß gebracht, rasch und gründlich vermischt und mit tunlichster Beschleunigung in die Kammer gefüllt. Die erste Ablesung konnte bereits 30 Sekunden nach dem Vermengen vorgenommen werden. Schon nach diesem kurzen Intervall war der IW. regelmäßig höher (z. B. 1190 TT. in der 2 cm-Kammer) als der nach der Mischungsformel berechnete IW. (z. B, 1152 TT.) und im weiteren Verlauf der Beobachtung stieg er stetig (in dem hier zitierten Beispiel bis auf 1401 TT.) innerhalb von 15 Minuten. Wir sahen demnach bei kontinuierlichem Hineinblicken in das Okular des Instrumentes ein ausgiebiges, anfangs rasches, nach wenigen Minuten sich verlangsamendes Wandern der Streifen des Interferenzspektrums nach links (im Sinne einer Zunahme der Refraktion). Wegen der Schnelligkeit des Reaktionsablaufes gingen wir so vor, daß der eine von uns in kurzen, beliebigen Intervallen die IW. ablas, während der andere die abgelesenen Werte notierte und die korrespondierenden Zeiten feststellte. Die so erhaltenen Werte wurden in ein Koordinatensystem eingetragen, wobei sich nach mehrfachen Versuchen ergab, daß die Verbindungslinie der Werte mit großer Annäherung eine Parabel darstellt. Für den in der nebenstehenden Abbildung graphisch dargestellten Versuch lautete die Formel der Kurve approximativ $y^2 = 2\,x \,.\, 4500$. Mit der Abschwächung der Fermentlösung verflacht die Kurve, ohne daß sie den Charakter der Parabel einbüßt.

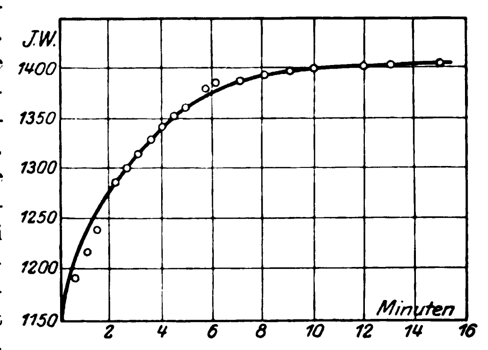


Abb. 1. Interferometrische Messung des Reaktionsablaufes bei der Einwirkung von Urease auf Harnstoff.

Als Ergebnis dieser Untersuchungen dürfen wir die Tatsache buchen, daß es rasch verlaufende fermentative Spaltungen gibt, welche imstande sind, binnen 15 Minuten die Refraktion einer $^{n}/_{10}$-, also relativ verdünnten Lösung des fermenteszibleu Substrates ganz beträchtlich (um 211 TT. in der 2 cm-Kammer des Interferometers) zu erhöhen. Dabei muß es allerdings dahingestellt bleiben, ob die Beeinflussung der Refraktion nur durch die Umsetzung des Harnstoffes in Ammoniumcarbonat zustande kommt oder ob an dem Gesamteffekt auch die Ureaselösung partizipiert; Bestimmungen der Refraktion von Ammoniumcarbonat und zwar von Mengen, welche der verwendeten Harnstoffkonzentration äquivalent sind, haben wir noch nicht ausgeführt, werden aber die Daten demnächst nachtragen.

Zugleich lernten wir im interferometrischen Verfahren eine vorzügliche, eines weiteren Ausbaues fähige Methode der Beobachtung der Wirkung der Urease und ähnlicher Fermente kennen, eine Methode, bei welcher man den Reaktionsablauf mit dem Auge kontrollieren und seine zeitlichen Bedingungen in einer ebenso exakten wie einfachen Weise ermitteln kann.

Wir konstatieren jedoch abermals, daß die Hauptstärke der optischen Untersuchung in ihrer Anwendung auf Reaktionen liegt, deren Mechanismus uns so weit bekannt ist, daß wir wissen, auf welchen stofflichen Veränderungen die einzelnen Phasen der Refraktionsänderung beruhen. Bei der Urease würden die Refraktionsbestimmungen wohl zu falschen, zumindest aber zu sehr unvollkommenen Vorstellungen über die Fermentation des Harnstoffs führen, wenn wir nicht wüßten, daß die Refraktion trotz hydrolytischer Spaltung und Wasseraustritt zunehmen kann, weil das entstehende Ammoniumcarbonat eine höhere Molekularrefraktion besitzt, als das der Summe seiner Atomrefraktionen entsprechen würde. Ganz geklärt sind die Beziehungen zwischen optischem und chemischem Geschehen — wie schon angedeutet — durch unsere hier angeführten Versuche über die Harnstoffspaltung durch Urease nicht; aber sie sind jedenfalls einer Klärung zugänglich, und es liegt sogar im Bereiche der Möglichkeit, daß die optischen Vorgänge auf die Natur der chemischen Umsetzung Licht werfen. Wir kommen darauf an anderer Stelle zurück. Wüßte man jedoch nicht, daß der fermenteszible Körper Harnstoff ist und daß er in Ammoniumcarbonat umgesetzt wird, so wäre mit den Interferometerbefunden nicht viel anzufangen; es bliebe dann eben bei der Aussage, daß eine unbekannte Alteration der chemischen Beschaffenheit des Reaktionsgemisches eingetreten sein muß.

Bemerkenswert erscheint schließlich, daß die Urease, ein isoliertes Bakterienferment, eine Refraktionszunahme hervorruft. Aus den grundlegenden Untersuchungen von Obermayer und E. P. Pick ging nur hervor, daß bakterielle Fermentationen (Enzyme der Proteusbakterien, Kolibacillen, Choleravibrionen) zu Refraktionsabnahmen führen; doch hat Hirsch später angegeben, daß je nach der (von Hirsch nicht näher bezeichneten) Bakterienart auch Zunahmen des Brechungsvermögens eintreten können, die im Interferometer ablesbar sind.

ad b). Die Lipase des Meerschweinchenserums zogen wir als Prototyp eines Serumfermentes heran, welches ebenfalls rasch wirkt. Zur Kontrolle bedienten wir uns der von Rona und Michaelis beschriebenen stalagmometrischen Methode.

Versuch: Interferometrische Beobachtung einer Lipolyse durch Serumlipase. 10 ccm Tributyrinwasser, nach Vorschrift frisch bereitet und im Verhältnis 1 : 10 mit Phosphatgemisch versetzt, werden mit 0,4 ccm 10fach verdünnten, frischen Meerschweinchenserums vermengt. Die Kontrolle mit inaktiviertem Serum zeigte weder interferometrisch noch stalagmometrisch meßbare Ausschläge. Über den Ausfall der Proben bei Verwendung von aktivem Serum orientiert nachstehende Tabelle:

Nach dem Vermengen abgelaufene Zeit in Minuten	IW. in der 2 cm-Kammer. — Vergleichsflüssigkeit: Destilliertes Wasser in TT.	Stalagmometrische Methode. Tropfenzahl[1])
2	1438	213
10	1438,5	195
20	1438	180
30	1438	177
40	1438	176
60	1438	176
Differenz zwischen Beginn und Ende der Lipolyse	—	37

Die Abnahme der Oberflächenspannung um 37 Tropfen entspricht ungefähr den von anderen Autoren (Michaelis, Ohlsen u. a.) mit der gleichen Methode für die Lipase des Meerschweinchenserums gefundenen Zahlen und beweist, daß die Reaktion tatsächlich in dem gewöhnlichen Umfang stattgefunden hat. Trotzdem blieb der IW. unverändert.

ad c). Ein proteolytisches Ferment der enteralen Verdauung, dessen Wirkung ebenso rasch verläuft wie die Immunpräcipitation, ist unbekannt. Im übrigen wissen wir durch Obermayer und E. P. Pick, daß die peptische Verdauung von Proteinen die Refraktion der Verdauungsgemische trotz weitgehender Aufspaltung unverändert läßt, wogegen Trypsin eine geringe Refraktionserhöhung hervorruft. In neuerer Zeit berichtete Hirsch, daß auch Pepsinverdauung Steigerungen der Refraktion bewirken kann, die interferometrisch bei der Untersuchung mit monochromatischem Licht wahrnehmbar werden.

[1]) Der von uns verwendete Tropfenzähler gab für destilliertes Wasser ca. 160 Tropfen.

Nach Obermayer und E. P. Pick hängt die refraktionssteigernde Wirkung des Trypsins ab: a) von der Art des Ausgangsmateriales; sie tritt z. B. bei dem weniger trypsinfesten Pferdeserum schon im nativen Zustande auf, bei dem trypsinfesten Rinderserum erst nach vorausgegangener Dialyse und Erwärmung auf 80° C; b) von der Konzentration des Materiales. In Pferdeserum, welches man über die Hälfte hinaus verdünnt hat, ist die Refraktionserhöhung nicht mehr nachweisbar. — Obermayer und E. P. Pick konnten die refraktionserhöhende Wirkung überhaupt nur in der ersten Phase der Trypsinverdauung beobachten; nach 24 Stunden kam sie zum Stillstand, während die chemischen Analysen ein kräftiges Fortschreiten der Spaltungsprozesse bewiesen. Sie glauben daher, daß die refraktionserhöhende Wirkung nur einer Komponente des Gesamtfermentes zuzuschreiben ist, welche nicht nur hydrolytische Spaltungen, sondern auch tiefergehende, „konstitutive" Veränderungen herbeizuführen vermag. In fallenden Konzentrationen von Witte-Pepton (10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%) nahm die refraktionserhöhende Wirkung des Trypsins ebenfalls rasch ab, in der 1 proz. Lösung war sie nur ganz gering und in der 0,5 proz. mit dem Refraktometer gar nicht mehr nachweisbar.

Auch bei der Messung mit dem empfindlicheren Interferometer sind die Refraktionserhöhungen durch tryptische Spaltung oft unbedeutend; bei der Einwirkung von Trypsin auf Pepton lassen sie sich stets erst in Stunden nachweisen, wenigstens in Konzentrationen unter 1%.

Bei Verwendung von Pepton Roche[1]) in 0,4—0,8 proz. wässeriger Lösung und einer durch Zentrifugieren geklärten Solution von Trypsin Kahlbaum erhielten wir (bei der Untersuchung im achromatisierten weißen Licht) stets nur ganz unbedeutende Ausschläge innerhalb 12—14 Stunden, während die gleichzeitige Bestimmung[2]) der Umwandlung des N in Amino-N jedesmal einen bedeutenden Abbau erkennen ließ. Die direkte Beobachtung der Trypsinwirkung in der Interferometerkammer ergab im Laufe der ersten Stunde überhaupt keine meßbare Änderung der Refraktion.

[1]) Das benutzte neue „Pepton Roche" ist nach Angabe der Firma Hoffmann-La Roche ein Polypeptid oder ein Gemisch von Polypeptiden, das sich durch nahezu konstante Zusammensetzung und fast konstante physikalische Eigenschaften auszeichnet. Es wird durch Pepsin wie durch Trypsin gut abgebaut. — Optisches Drehungsvermögen in 4 proz. wässeriger Lösung —51,0°; Acidität: 1 g verbraucht bis zur Lackmusneutralität 0,8 ccm $^n/_{10}$-KOH; Gesamt-N = 13,41%; formoltitrierbarer N = 3,36%; Asche = 1,62%.

[2]) Diese Titrationen hat Dr. Guggenheim, dem wir auch an dieser Stelle bestens danken, im Laboratorium der Firma Hoffmann-La Roche (Basel) ausgeführt.

Versuch: 0,8% Pepton Roche gelöst in 0,4% Natriumcarbonatlösung + Trypsinlösung $\bar{\bar{aa}}$.

Nach dem Vermengen abgelaufene Zeit	IW. in der 2 cm-Kammer	Formoltiter (100 ccm verbrauchten bei der Formoltitration)
Einige Sekunden	1268 TT.	18,4 ccm $^n/_{10}$-KOH
12 Stunden bei 56° C	1286 „	30,53 „ „
Zunahme	18 „	12,13 „ „

5. Das Verhalten der Refraktion beim Vermengen von Eiweißlösungen (Serum) mit Basen oder mit Säuren.

In seiner ersten Mitteilung über die interferometrische Analyse der Immunpräcipitation konstatierte Doerr, daß sich in allen Versuchen, in welchen er die spezifischen Präcipitate in 1 proz. Thorsulfat zur Wiederauflösung brachte, Minuswerte (gegenüber den berechneten IW.) ergaben. Dies war übrigens auch dann der Fall, wenn die Flockung nicht durch eine Antigen-Antikörperreaktion, sondern kolloidchemisch durch Salze der seltenen Erden hervorgerufen wurde; Minuswerte wurden endlich selbst bei einfachem Vermengen von Serum mit 1% Thorsulfat in solchen Proportionen erzielt, daß die Eiweißfällung infolge des Überschusses einer Reaktionskomponente ganz ausblieb. Doerr hat in Aussicht gestellt, auf die Ursachen des geschilderten Verhaltens an anderer Stelle zurückzukommen, was nun hier geschehen soll.

Über das Verhalten der Refraktion von Eiweißlösungen beim Vermengen mit Elektrolyten finden sich in der Literatur widersprechende Angaben. W. Frei gab an, daß Alkalisieren und Ansäuern von Eiweißlösungen den Brechungsexponenten 2 proz. Gelatinelösungen herabsetze und daß Zusatz gewisser Ionen denselben erhöhe. Herlitzka hatte schon früher beobachtet, daß die spezifische Refraktion sich bei solchen Versuchen nicht ändere, und trat Frei entgegen. Walpole sah bei Gelatinesolen und Gelen keine Refraktionsänderung durch Basen-Säure-Salzzusätze. Uns kam es hier zunächst nicht so sehr darauf an, das Verhalten der spezifischen Refraktion im allgemeinen zu studieren, als vielmehr einen Anhalt über das optische Mischungsergebnis bei den von uns gewählten Versuchsbedingungen zu gewinnen.

Aus unseren Untersuchungen erhellt, daß die von Doerr beobachteten Minuswerte auf einer Einwirkung der von Doerr benutzten Auflösungsmittel auf die Präcipitate, speziell auf die

Eiweißkörper der Präcipiate beruhen; wie schon Doerr betonte, ist das Auflösen von Eiweißflockungen zum Zustandekommen der Erscheinung nicht notwendig, vielmehr tritt dieselbe eher noch stärker auf, wenn man die Eiweißsole unter Vermeidung jeder Niederschlagsbildung mit den Lösungen der Salze seltener Erden vermengt. Diese Gemenge zeigen durchwegs einen niedrigeren IW., als man nach der Mischungsformel erwarten würde, also Refraktionsverminderung.

In den folgenden Versuchen wurden stets zwei vorher interferometrisch gemessene Flüssigkeiten zu gleichen Teilen vermischt. Der Abmessungsfehler wurde durch Verwendung derselben Pipette für jedes Flüssigkeitspaar auf das Mindestmaß verringert. Die Pipette spülten wir sorgfältig mit destilliertem Wasser und hierauf mit der zweiten abzumessenden Flüssigkeit durch, indem wir in verschiedene Gefäße die zu Spülzwecken erforderlichen Volumina abfüllten, so daß die Stammlösung natürlich vor jeder Verdünnung geschützt war. Die Unterschiede zwischen Parallelproben desselben Flüssigkeitspaares fielen — diesen Kautelen entsprechend — mit einer einzigen Ausnahme sehr gering aus. Man kann in Anbetracht dieser Sicherungsmaßnahmen und mit Rücksicht auf die ziemlich gesetzmäßige Abstufung der Resultate in Reihenversuchen die Möglichkeit sicher ausschließen, daß die gefundenen Minuswerte auf Manipulationsfehlern beruhen; vielmehr muß die Ursache in Vorgängen gesucht werden, die sich beim Vermengen von Serum mit Lösungen saurer Salze abspielen.

Bei Zusatz von $^n/_{100}$-NaOH zeigten die Differenzen im Reihenversuch keine gesetzmäßige Abstufung und ließen nur in ihrer Gesamtheit die Tendenz zu Minuswerten erkennen. Viele Differenzwerte in den Laugenversuchen entsprachen der Größe nach dem durch Streifenverwechslung bedingten Fehler. Daß tatsächlich gerade hier solche Streifenverwechslungen vorgekommen sein mögen, wird dadurch wahrscheinlich, daß die Wahl des richtigen Streifenpaares wiederholt offenbleiben mußte, sei es nun für die Serumverdünnung selbst oder für das Gemenge derselben mit der Lauge; im gleichen Sinne dürfte man einzelne Unstimmigkeiten zwischen den Messungen in der 4 cm- und in der 2 cm-Kammer auslegen.

Über die Größe der Refraktionsverminderungen geben die folgenden Versuchsprotokolle Aufschluß; die Konzentrationen

der Natronlauge, des Thorsulfats und des Thornitrats wurden so gewählt, wie sie in einem Teile der Hauptversuche über die Vorgänge bei der Immunpräcipitation zur Anwendung gelangten.

a) Serumverdünnungen + $^{n}/_{100}$-NaOH $\overline{aa}$.

Konzentration des Serums	Differenzen in der 4 cm-Kammer	Differenzen in der 2 cm-Kammer
$^{1}/_{5}$	−22 −20 −19	−3,5 −3,5 +0,5
$^{1}/_{10}$	−20 −13	−14 −10
$^{1}/_{20}$	−30 −8	−24 −24
$^{1}/_{40}$	0 +5	+4 +6

b) Serumverdünnungen + 1proz. Thorsulfatlösung $\overline{aa}$.

$^{1}/_{5}$	Fällung	Fällung
$^{1}/_{10}$	Fällung	Fällung
$^{1}/_{20}$	−45 −43	−14 −13
$^{1}/_{40}$	−21	−5

c) Serumverdünnungen + 1proz. Thornitratlösung $\overline{aa}$.

$^{1}/_{5}$	−233 −233	−119 −117
$^{1}/_{10}$	−119 −123	−48 −48
$^{1}/_{20}$	−125 −125	−51 −51
$^{1}/_{40}$	−101 −96	−31 −12

Der Grad der Refraktionsverminderung hängt also, wie wir aus den angeführten und zahlreichen weiteren Messungen schließen dürfen, in erster Linie von der Art und von der Reaktion der zum Eiweißsol zugesetzten Lösung ab; daher der starke Effekt des stets sehr sauer reagierenden Thornitrats im Vergleich zu dem weit schwächer wirkenden und auch weniger sauer reagierenden Thorsulfat. Die $^{n}/_{100}$-NaOH lieferten die kleinsten Minuswerte; ob konzentriertere Lösungen, wie sie P. Hirsch benützte, z. B. $^{n}/_{10}$-NaOH, die Refraktion der Gemenge nicht tiefer herabdrücken, wurde vorläufig nicht untersucht.

An der Refraktionsverminderung beteiligen sich sowohl Reaktionen der Säuren (resp. Basen) mit den Eiweißkörpern als auch solche mit den dialysablen Stoffen der Sera, wie man durch Zerlegung einer Serumprobe mittels Dialyse und gesonderte Prüfung des nichtdialysablen und des dialysablen Anteiles feststellen kann. Für die Reaktion zwischen den dialysablen Serumanteilen (Alkalien der Sera) und den sauren Salzen der seltenen Erden kommen wohl Salzbildungen nach dem Typus HCl + NaOH in Betracht. Die (dem absoluten Werte nach sogar größere) Refraktionsverminderung, welche auch das salzarm dialysierte Eiweiß beim Vermischen mit Thorlösungen zeigt, könnte ebenfalls auf einer Bindung zwischen der abdissoziierten Säure der Thorsalze und dem als Base fungierenden Serumeiweiß unter Freiwerden von Wasser (Hydratwasser des Eiweißes?)

beruhen; vielleicht kommt es auch zu konstitutiven Veränderungen der Moleküle oder zu Volumsdilatationen. Zweifellos findet jedoch nicht nur die Säure, sondern auch die Lauge im Serum chemische Angriffspunkte (Alkalialbuminate, Racemisierung der Proteine); ob diese Laugenreaktionen zu Refraktionsverminderungen Anlaß geben, müßten Experimente mit höheren NaOH-Konzentrationen lehren.

Für die Verwendung von Natronlauge, Thorsulfat und Thornitrat als Lösungsmittel für Eiweißniederschläge ergibt sich somit die Tatsache, daß solche Auflösungen ausnahmslos mit Refraktionsverminderungen verknüpft sind, die bei $^{n}/_{100}$-NaOH noch in die Fehlergrenze der Streifenverwechslung fallen, bei Thorsulfat jedoch erheblicher werden und bei Thornitrat ganz bedeutend sein können. Thornitratlösungen reagierten — wie erwähnt — stärker sauer als Thorsulfatlösungen und von 2 von uns geprüften Thornitratpräparaten gab das eine nicht nur viel sauerere Lösungen, sondern auch größere Minusabweichungen.

Nichtsdestoweniger haben wir in der vorliegenden Arbeit neben stark verdünnten ($^{n}/_{100}$-) Laugen auch wieder Salze der seltenen Erden zur Lösung der Präcipitate verwendet, weil letztere auf das Eiweißmolekül anders wie die Laugen und trotz der größeren Minusabweichungen schonender einwirken; das durch Thor gefällte Eiweiß löst sich im Überschuß einer Komponente wieder, die Dispersion erfolgt also zweifellos rein physikalisch. Das Auftreten der durch die abdissoziierte oder verunreinigende Säure bedingten größeren Minuswerte stört den Vergleich einer Thorfällung mit einer Immunpräcipitation, auf den Doerr zunächst seine Beweisführung fundierte, nur wenig.

Aus der Abhängigkeit der Größe der Refraktionsverminderung von der Eiweißkonzentration kann man eine technische Konsequenz, welche die interferometrische Analyse der Eiweißfällungen betrifft, ableiten. P. Hirsch sowohl als Doerr trennten die Präcipitate von den überstehenden Flüssigkeiten ab, bevor sie dieselben auflösten; das ist aber nicht unbedingt notwendig, man kann das gesamte Reaktionsgemisch klären, die Präcipitation also gewissermaßen wieder rückgängig machen, wenn man das Dispersionsmittel (NaOH, Thorsulfat, Thornitrat) zu dem Reaktionsvolum (Präcipitat plus überstehende Flüssigkeit) zusetzt. Im letzteren Falle sind die Manipulationsfehler, speziell die Fehler der volumetrischen Abmessungen weit geringer; aber dieser Vorteil

wird bisweilen durch sehr starke Minusabweichungen überkompensiert, da nicht nur die Eiweißkörper des Präcipitates, sondern auch jene der überstehenden Flüssigkeiten an der zur Refraktionsverminderung führenden Reaktion partizipieren.

6. Refraktionsbestimmungen bei kolloid-chemischen Eiweißflockungen.

Wie bereits Doerr ausgeführt hat, liefert die refraktometrische Untersuchung von rein physikochemischen Präcipitationen ein wichtiges Korrelat des optischen Studiums der Immunpräcipitation. Wenn der Mechanismus der letzteren de facto in einem interferometrisch nachweisbaren fermentativen Eiweißabbau bestehen sollte, müßte man erwarten, daß sich zwischen den beiden Arten der Eiweißflockung konstante und meßbare Unterschiede feststellen lassen. Trifft das aber nicht zu, dann bleibt eben auch für die Immunpräcipitation die Intervention einer Proteolyse unbewiesen.

Doerr konnte zeigen, daß solche Unterschiede zwischen rein kolloidaler Eiweißfällung und spezifischer Immunpräcipitation nicht bestehen. Wir wiederholten diese Versuche mit der vervollkommneten Methodik, wie wir sie für die Analyse der Immunpräcipitationen benützten (siehe Abschnitt II), und konnten die Befunde von Doerr bestätigen. Aus der großen Zahl neuer Experimente über Eiweißfällungen durch seltene Erden, die sich wegen der ausgezeichneten Reversibilität der Flockung für solche Zwecke besonders eignen (Doerr), heben wir nur ein paar Beispiele hervor. Der Wert des Präcipitates wurde in der in Abschnitt II ausgeführten Weise berechnet (aus dem theoretischen Sollwert des Gemenges von Serum und Thorsalz durch Abziehen des IW. der nach eingetretener Flockung über dem Niederschlag stehenden Flüssigkeit) und direkt nach Lösung des Präcipitates gemessen; in den nachstehenden Tabellen wird nur die Differenz zwischen berechnetem und beobachtetem IW. des Präcipitates angegeben.

Versuch: $^1/_{40}$ Pferdeserum + 0,05% Thorsulfat. — Flockung. — Auflösung des abgesonderten Präcipitates in 1 proz. Thorsulfat. — 4 cm-Kammer.

Probe a) Differenz = +11 TT.
„ b) „ = − 6 „
„ c) „ = +16 „

Versuch: Dieselbe Anordnung wie im vorigen Versuch.
Differenz = +17 TT.

Versuch: $^1/_{20}$ Pferdeserum + 0,4 proz. Cerchlorürauflösung des Präcipitates in 1 proz. Thornitrat.

Differenz	bei	Probe	a)	−36	TT.
„	„	„	b)	−34	„
„	„	„	c)	−25	„

Versuch: $^1/_{20}$ Pferdeserum + 0,05% Thornitrat. — Das Präcipitat wird nicht isoliert, sondern das ganze Reaktionsgemisch durch 1% Thornitrat geklärt.

Differenz	in	der	4 cm-Kammer:	Probe a)	−7	TT.
„	„	„	„	„ b)	−50	„
„	„	„	2 cm-Kammer:	Probe a)	−5	„
„	„	„	„	„ b)	−19	„

Versuch: $^1/_{20}$ Pferdeserum + 0,4% Cerchlorür, sonst wie der vorstehende Versuch.

Differenz	in	der	4 cm-Kammer	−22	TT.
„	„	„	2 cm-Kammer	− 6	„

Die Differenzen sind also gering und liegen im Bereiche der Fehlerquellen. Bei Flockungen von Eiweißsolen durch seltene Erden erleidet das Reaktionsgemisch einen Substanzverlust, der sich, soweit das Interferometer Aufschluß gibt, quantitativ im Präcipitat wieder nachweisen läßt. Das ist das Ergebnis, auf welches wir hier a priori rechnen dürfen. Wie steht es nun mit der Interferometrie der Immunpräcipitationen?

II. Refraktionsbestimmungen bei Immunpräcipitationen.

Die Refraktionsbestimmungen bei der Immunpräcipitation verfolgen im Rahmen der in dieser Arbeit diskutierten Probleme den Zweck, festzustellen, ob sich nach dem Vermengen von Präcipitinogen und Präcipitin und zwar noch vor Eintritt der Flockung oder doch gleichzeitig mit derselben ein Prozeß abspielt, der in einer Refraktionserhöhung des Gemisches zum Ausdruck kommt. Es wird daher zunächst aus den gemessenen Refraktionen der Antigen- und der Antiserumlösung der Sollwert ihres Gemenges nach der Mischungsformel berechnet, jener Wert, den das Gemenge haben müßte, wenn sich seine beiden Komponenten mischen lassen, ohne miteinander zu reagieren. Mit diesem berechneten Sollwert wird dann der tatsächliche Wert des Gemenges verglichen (beob. IW.). Das ist das Prinzip, welches allen derartigen Untersuchungsmethoden gemein ist;

die Differenzen derselben beruhen auf der besonderen Art und Weise, wie der „beobachtete Refraktionswert“ ermittelt wird.

Nach dem Ausfallen des Präcipitates kann der Refraktionswert des Gemenges nicht mehr direkt abgelesen werden. P. Hirsch ging daher so vor, daß er das Reaktionsgemisch in Präcipitat und überstehende Flüssigkeit sonderte und nun bestimmte: a) den Refraktionswert der über dem Präcipitat stehenden Flüssigkeit und b) die Refraktion des Präcipitates nach Auflösung desselben mit $^{n}/_{10}$-NaOH, wobei die gleiche Laugenverdünnung als Vergleichsflüssigkeit diente. Die Werte von a) und b) wurden addiert und mit dem berechneten Sollwert verglichen.

Doerr hat diese Technik schon in seiner ersten Versuchsreihe in wesentlichen Punkten modifiziert. Hirsch brachte die Antigen-Antikörpergemenge für 24 Stunden in einen auf 38° C eingestellten Thermostaten, und ebenso führte Langenstrass seine Versuche aus. Dieses Vorgehen involviert jedoch eine ganz bedeutende Erhöhung der Gefahr bakterieller Verunreinigungen und gestattet nicht, den primären, bekanntlich sehr rasch ablaufenden Prozeß der Antigen-Antikörperreaktion, der die Flockung auslöst, von sekundären, durch die Bruttemperatur begünstigten Vorgängen auseinanderzuhalten. Solche sekundäre Vorgänge, eventuell auch solche fermentativer Natur könnten leicht eintreten. Weiß man doch, daß frische Sera im Kontakt mit beliebigen Substraten (gekochten Organen, Kaolin usw.) dialysable, mit Ninhydrin reagierende Stoffe bilden, wenn man sie stundenlang bei 37° C digeriert; nach de Waele genügt es, wenn man frische Sera mit destilliertem Wasser verdünnt, bis Globulinflockung eintritt, um bei der nachfolgenden Bebrütung eine positive „Abderhalden-Reaktion“ zu erzielen. Zudem haben weder Hirsch noch Langenstrass Angaben gemacht, wie sich die verwendeten Antigenlösungen und die Immunserumverdünnungen unvermischt verhalten, d. h. man erfährt nicht, ob sich der interferometrische Wert der Reaktionskomponenten nicht schon an sich durch die bloße Digestion verändert haben würde[1]).

---

[1]) Ferner vermißt man noch eine andere, vermutlich sehr wichtige Kontrolle. Beim Ansetzen der Präcipitinreaktionen vermischt man eine Serumverdünnung, z. B. verdünntes Pferdeserum, als Antigen mit einem Antiserum, welches vom Kaninchen stammt. Es wäre daher notwendig gewesen, Pferdeserum und Normalkaninchenserum in den im Haupt-

Die von Hirsch bewerkstelligte Trennung des Präcipitates von der überstehenden Flüssigkeit mit nachfolgendem Trocknen, Waschen und Wiederauflösen des Niederschlages kann selbst bei peinlich genauem Arbeiten zu einer Quelle von Irrtümern werden. Substanzverluste sind bei dieser Technik wohl nur schwer zu vermeiden; in Wasser, Äther oder Alkohol lösliche Stoffe der Präcipitate scheiden, da letztere mit diesen Solvenzien gewaschen werden, eo ipso aus; die Refraktion der Eiweißkörper erleidet durch das scharfe Eintrocknen ebenso wie durch die Auflösung in stärkerer Lauge ($^{n}/_{10}$-NaOH) Veränderungen; endlich wird in der Berechnung der Befunde das Präcipitatvolum vernachlässigt.

Bei unseren hier mitgeteilten Untersuchungen haben wir daher nur zum Teil die von Hirsch eingeführte indirekte Methode der Refraktionsbestimmung angewendet und waren überdies bemüht, dieselbe in mehrfachen Beziehungen, namentlich auch in der von Doerr eingeschlagenen Richtung weiter auszubauen. Daneben benutzten wir aber eine prinzipiell neue direkte Methode der interferometrischen Analyse der Immunpräcipitation unter Ausschluß von Zusätzen (Lösungsmitteln), und diese direkte Methode brachte die Entscheidung der eingangs gestellten Frage.

---

versuch verwendeten Proportionen und unter Gleichhaltung aller übrigen Bedingungen (gleiches Alter der Sera) zu vermengen, die Gemenge 24 Stunden bei 38° C zu halten und dieselben vor und nach der Digestion zu interferometrieren. — Auf eine Besprechung der ziffernmäßigen Befunde, welche Hirsch und Langenstrass bei der interferometrischen Analyse der Immunpräcipitation bekamen, soll hier verzichtet werden; eine Durchsicht der Tabellen, welche Langenstrass (Fermentforschung **3**, 29—32) veröffentlicht hat, gibt über die Inkonstanz und die Widersprüche der Resultate hinreichenden Aufschluß. Langenstrass bekam vielfach bedeutende Refraktionsverminderungen ganz im Gegensatze zu der von ihm vertretenen Theorie; und wo ausnahmsweise (6 unter 28 Fällen) Refraktionserhöhungen konstatiert wurden, die mehr als + 7 Trommelteile betrugen, zeigten sie im Reihenversuch (mit fallenden Antigenkonzentrationen) eine außerordentliche Regellosigkeit. Vor allem aber wurden sie eben erst nach 24stündiger Bebrütung festgestellt und nicht nach der Zeit, zu welcher die Präcipitation eben eingetreten oder gerade abgelaufen ist, ein Umstand, welcher die Verwertbarkeit der Befunde von Hirsch und Langenstrass für unsere Fragestellung, wie oben auseinandergesetzt, verhindert.

1. Indirekte Refraktionsbestimmungen des ausgeflockten Antigen-Antikörpergemenges.

Die von uns benützten Modifikationen der indirekten Methode bestehen:

1. In einer Abkürzung des Zeitintervalles zwischen dem Ansetzen der Reaktion und dem Ablesen der IW. auf durchschnittlich $^1/_2$—3 Stunden. Gleichzeitig schalteten wir höhere Temperaturen (25—38° C) völlig aus und ließen die Reaktion bei Zimmertemperatur oder im Eisschrank ablaufen. Bei einem wirksamen Präcipitin tritt die Flockung fast momentan oder doch in wenigen Minuten und bei jeder Temperatur ein, was, nebenbei bemerkt, schon an sich den Gedanken an eine bis zu den Aminosäuren reichende Proteolyse fast ausschließt, da in diesem Falle das Eiweißmolekül bei niedriger Temperatur förmlich explodieren müßte. Was Zeit erfordert, ist nur die Vergrößerung und Sedimentierung der gebildeten Eiweißflocken, ein Phänomen, dessen Eintritt man zur Refraktionsbestimmung nicht erst abzuwarten braucht. Wir verzeichneten übrigens ganz gleiche Ergebnisse, ob wir nun die optische Untersuchung vor oder erst nach der spontanen Sedimentierung vornahmen. Bei längere Zeit beanspruchenden Experimenten wurden die Ausgangslösungen zu Kontrollzwecken sowohl am Anfang wie am Ende der interferometrischen Prüfungen ausgemessen.

2. In einer Einschränkung der mit dem Präcipitat vorgenommenen Manipulationen. Das Präcipitat wurde nach vorsichtigem Abhebern der überstehenden Flüssigkeit noch in feuchtem Zustande gelöst (Methode der Auflösung des isolierten, feuchten Präcipitates) oder es wurde das Präcipitat in der überstehenden Flüssigkeit dispergiert, indem man das Dispersionsmittel dem ganzen Reaktionsgemisch zusetzte, so daß letzteres wieder homogen und durchsichtig wurde (Methode der Klärung des Reaktionsgemisches).

3. In der Anwendung mehrerer Lösungs- (Dispersions-) Mittel ($^n/_{100}$-NaOH, 1% Thorsulfat, 1% Thornitrat) nebeneinander, d. h. bei einem und demselben Antigen-Antikörpergemisch.

4. In der exakten Berücksichtigung der Volumina bei Anwendung der allgemeinen Mischungsformel zur Berechnung der Gemischt-(Soll-) Werte der Gemenge. Es wurden also Präcipitate, überstehende Flüssigkeiten und Auflösungsmittel mit ihrem wahren Volum ins Kalkül eingestellt. Wenn in 20 ccm Reaktionsvolum ein Präcipitat entsteht, welches nach Zentrifugenkompression den Raum von 1 ccm einnimmt, so darf man natürlich nicht mehr mit 20, sondern nur mit 19 ccm überstehender Flüssigkeit rechnen. Das Detail der Berechnung wird durch die späteren Ausführungen noch klarer werden.

Durch diese Korrekturen erreichten wir eine größere Annäherung der beobachteten an die berechneten Werte; sie ließen sich noch nachträglich an den von Doerr in seiner ersten Arbeit mitgeteilten Ziffern anbringen und führten auch dort zu einer besseren Übereinstimmung zwischen Rechnung und Beobachtung.

Das Reaktionsvolum wurde wieder möglichst groß, meist zu 20 ccm gewählt, um alle Meß- und etwaigen Verdunstungsfehler tunlichst zu reduzieren. Ferner ermittelten wir durch Vorversuche jene refraktometrische Einstellung der im eigentlichen Experiment verwendeten Flüssigkeiten, bei welcher alle interferometrischen Ablesungen in das Intervall zwischen 25—1300 TT. fallen; auch wurde immer darauf geachtet, daß der IW. der über dem Präcipitate stehenden Flüssigkeit nicht unter den IW. der benützten Vergleichsflüssigkeit fällt, was aus mehreren Gründen unerwünscht ist.

Zur Einführung in die Versuchsanordnungen sei nachstehend ein Beispiel mit der Methode des isolierten Präcipitates und ein zweites mit der Methode der Klärung des Reaktionsgemisches ganz durchgerechnet; anschließend wollen wir die erzielten Ergebnisse besprechen.

Versuche mit Auflösung der nichtisolierten Präcipitate. (Klärung der Reaktionsgemische.)

Manipulationen, Berechnung und Beweisführung sind weitaus am einfachsten, wenn man die Niederschläge nicht isoliert, sondern das Dispersionsmittel (Lösungsmittel) zum gesamten Reaktionsvolum des ausgeflockten Serum-Antiserumgemenges zusetzt. Zu diesem Behufe bringt man zunächst gleiche Volumina Antigenverdünnung und Antiserumverdünnung

Beispiel für Untersuchungsgang und Berechnung (Vergleichsflüssigkeit: 1,8% NaCl-Lösung).

Bestimmte Flüssigkeiten		Interferometerwerte 2 ccm-Kammer	Interferometerwerte 0,5 ccm-Kammer
1. $^1/_{200}$-Pferdeserum		80,5	20
2. $^1/_5$-Antipferdeserum v. Kan. H_{39}		189,5	36
3. $^n/_{100}$-NaOH (Auflösungsmittel)		123,5	29
4. (1 + 2 aa) + 3 aa berechneter Sollwert		129,2	28,5
5. Gemenge 4 beobachtet (Pferdeserum + Antipferdeserum aa 10 ccm; 30 Min. später (nach eingetretener Präcipitation) kommen dazu 20 ccm Lösungsmittel. Es resultiert eine wasserklare Lösung. Von diesem Versuch werden drei gleichartige Proben a), b) und c) angesetzt und gemessen.	a)	128,5 oder 108,5	27
	b)	129,5 oder 114,5	29
	c)	125,5 oder 116,5	28
6. Differenz zwischen beobachteten und berechneten Werten .	a)	— 0,7 od. — 20,7	—1,5
	b)	+ 0,3 „ — 14,7	+0,5
	c)	— 3,4 „ — 12,5	—0,5

in einem Gefäße zusammen, wartet die Flockung ab und fügt nun zu dem Gemisch ein gleiches Volum Lösungsmittel hinzu. Der Gang der Berechnung wird durch folgende, aus der Mischungsformel abgeleitete Gleichung skizziert:

$$\frac{IW\,(\text{Antigen}) + IW\,(\text{Antiserum})}{4} + \frac{IW\,(\text{Lösungsmittel})}{2} = \text{berechneter}$$

Sollwert des Gemenges: Antigen-Antiserum-Lösungsmittel.

Diese Gleichung kann natürlich nur dann gelten, wenn infolge der Immunpräcipitation keine Refraktionsänderungen eintreten, wenn sich also die Immunpräcipitation verhält wie eine rein kolloidale Eiweißflockung.

Die Differenzen der drei Parallelproben sind sowohl untereinander (Manipulationsfehler) als auch gegenüber dem „berechneten Sollwert“ in beiden Kammern ganz geringfügig.

Die Differenzen gegenüber dem berechneten Sollwert sind nicht größer als mittlere Manipulationsfehler und geringer als die Unregelmäßigkeiten, die sich bei Ablesung gleicher Flüssigkeiten bei einfacher und doppelter Kammerlänge ergeben. Bei den Messungen in der 2 cm-Kammer machte sich die Unsicherheit der Streifenwahl geltend und zwar bei der Refraktionsbestimmung der geklärten Gemenge; im Endresultat schwankt daher die Differenz zwischen dem Glattwert (Null) und zwischen einem Minuswert von ungefähr 20 TT. — Wir vermerken diesen Vorfall, der insofern von Interesse ist, als man dieselbe Erscheinung bisweilen auch beobachtet, wenn man zu einem $^1/_5$-Kaninchenserum das gleiche Volum $^n/_{100}$-NaOH zufügt; auch dann kann sich die Schwierigkeit der Streifenwahl im selben Ausmaße einstellen und die Differenzen zwischen dem beobachteten Wert des Gemenges und seinem Sollwert schwanken ebenfalls je nach der

Immunserum	Konzentration des Antigens	Differenzen zwischen beobachtetem und berechnetem Wert					
		4 cm-Kammer			2 cm-Kammer		
		Bezeichnung der Proben					
		a	b	c	a	b	c
$^1/_5$ Antipferdeserum von Kaninchen H_{39}	1 : 100	— 29 *)	—	—	— 0,6	—	—
	1 : 200	— 0,7	+ 0,3	— 3,0	— 1,5	+ 0,5	— 0,5
	1 : 500	— 10,7	—	—	— 2,8	—	—
	1 : 1000	— 7,6	— 14,6	—	— 2,6	— 3,6	—
$^1/_5$ Antipferdeserum von Kaninchen H_{31}	1 : 10	— 12	—	—	+ 5	—	—
	1 : 400	— 6 **)	0	— 9	— 1	— 1	0

*) Ablesung vermutlich um eine Streifenbreite zu tief.

**) Ablesung unsicher; Differenz schwankend zwischen — 6 und — 26 bzw. zwischen 0 und — 20 bzw. — 9 und — 29.

Ablesung zwischen Null und dem Wert einer Streifenbreite (ca. 20 TT.). Mit der Präcipitation hat also dieses übrigens nicht wesentliche Detail nichts zu schaffen.

Dieser Versuchsausfall ist von der verwendeten Antigenkonzentration ganz unabhängig, wie Reihenversuche lehren, von denen hier nur die Schlußresultate (Differenzen zwischen beobachteten und berechneten Werten der geklärten Reaktionsgemische wiedergegeben seien (siehe vorstehende Tabelle S. 179).

Dagegen ändert sich der Versuchsausfall, wenn statt $^{n}/_{100}$-NaOH das stark refraktionsvermindernde Thornitrat in 1,2 proz. Lösung zur Auflösung der Niederschläge verwendet wird. Es kommen dann stärkere Minuswerte zur Beobachtung.

Immunserum	Konzentration des Antigens	Differenzen	
		4 cm-Kammer	2 cm-Kammer
$^{1}/_{5}$ Antipferdeserum von Kaninchen H_{31}	1 : 100	—48	—13,6
	1 : 500	—45,7	—14,7
	1 : 1000	—	—19,1

Versuche mit Auflösung der isolierten Präcipitate.

Dieses Verfahren lehnt sich unter den in dieser Arbeit verwendeten Versuchsanordnungen am meisten an die von Hirsch und Langenstrass geübte Technik an. Im einzelnen gingen wir dabei in folgender Weise vor:

Das Präcipitat wurde nach — bei Zimmertemperatur oder im Eisschrank — eingetretener Flockung und spontaner Sedimentierung durch Ausschleudern komprimiert, von der überstehenden Flüssigkeit durch Abhebern befreit, mit einem Lösungsmittel bekannter Refraktion wieder dispergiert und im Interferometer ausgemessen. Außerdem wurde der IW. der überstehenden Flüssigkeit direkt bestimmt.

Die Berechnung, d. h. der Vergleich der Sollwerte mit den beobachteten Werten kann auf zweierlei Weise erfolgen:

a) Man vergleicht die beobachtete mit der berechneten Lösung des Präcipitates.

Die Berechnung der Präcipitatlösung geschieht nach dem Schema:

$$\frac{IW(\text{des Antigens}) + IW(\text{des Immunserums})}{2} - IW$$ (der überstehenden Flüssigkeit) + IW. (des Lösungsmittels) = berechnete Präcipitatlösung.

b) Man vergleicht die Summe der Refraktionen der Ausgangskomponenten (Antigen- und Antiserumverdünnung, dividiert durch 2) mit der

Summe der Refraktionen der Endprodukte (IW. der überstehenden Flüssigkeit und IW. des Präcipitates). Den IW. des Präcipitates erhält man, wenn man vom IW. des gelösten Präcipitates den IW. des Lösungsmittels abzieht.

Es ist jedoch klar, daß in diese Schemata nicht einfach die abgelesenen IW. eingesetzt werden dürfen, sondern daß — wie an anderer Stelle bereits erwähnt wurde — die Volumina der überstehenden Flüssigkeit, des Präcipitates und des Lösungsmittels berücksichtigt werden müssen. Wenn das Volumen des feuchten Präcipitates 1 ccm beträgt, muß selbstverständlich ein verschiedener IW. resultieren, je nachdem das Präcipitat mit 20 ccm Lösungsmittel auf das Volumen von 21 ccm oder mit 19 ccm auf das von 20 ccm gebracht wird. In unseren Versuchen wurden in der Regel 10 ccm Antigenverdünnung mit 10 ccm Antiserumverdünnung versetzt; 20 ccm würden somit dem Volum des Reaktionsgemisches, 19 ccm dem der überstehenden Flüssigkeit entsprechen (bei 1 ccm Präcipitatvolum). Es erhellt übrigens aus der bloßen Betrachtung der Mischungsformel, daß das Volum bei allen Manipulationen und Rechnungen beachtet werden muß; von dieser Regel ist nur der Fall ausgenommen, daß man 2 Flüssigkeiten zu gleichen Teilen miteinander vermengt.

Auf Grund dieser Überlegungen haben wir das Volum der überstehenden Flüssigkeit jedesmal genau ausgemessen. Die Berechnung hat dann so zu erfolgen, daß man die allgemeine Mischungsformel benützt, wobei die Volumina eo ipso konsequent berücksichtigt werden müssen, oder daß man sich der obigen Vergleichsschemata bedient, in dieselbe aber nicht die abgelesenen IW., sondern die auf das gesamte Reaktionsvolum (in unseren Versuchen auf 20 ccm) reduzierten IW. einsetzt. Die Reduktion des bei einem Volum v_x abgelesenen Interferometerwertes IW_x auf das Volum v_n geschieht nach der Formel $IW_n = IW_x \frac{v_x}{v_n}$; in unserem Falle, d. h. bei dem Reaktionsvolum von 20 ccm ergibt sich $IW_{20} = IW_x \frac{v_x}{20}$.

Versuch (Berechnung nach Schema a). — Sämtliche Werte sind durch Multiplikation mit dem Faktor $\frac{v_x}{20}$ auf das Volum von 20 ccm reduziert. 4 cm-Kammer):

1.	Gemenge von Serum + Antiserum aa 10 ccm; berechnet	1630
2.	Überstehende Flüssigkeit	1451
3.	1. minus 2. = berechneter Präcipitatwert	179
4.	1% Thornitrat	132
5.	3. und 4. = berechnete Präcipitatlösung	311
6.	Präcipitatlösung beobachtet	306
7.	Differenz zwischen beobachtetem und berechnetem Wert	− 5

Für größere Versuchsreihen erscheint es nicht vorteilhaft, jeden abgelesenen Wert einzeln zu reduzieren. Man benützt dann besser eine durch Einsetzen der Mischungsformel in Schema a) ableitbare Gleichung, in welcher die Division durch 20 nur einmal vorgenommen werden muß:

$$IW\ (\text{Präcipitatlösung}) = \frac{IW(\text{Gemenge}) \cdot 20 - IW(\text{überst. Flüssigk.}) \cdot v_1 + IW(\text{Lösungsm.}) \cdot v_2}{20}$$

Berechnung desselben Beispieles nach Schema b).

1. Refraktionssumme, berechnet aus den Ausgangskomponenten 1630
2. Überstehende Flüssigkeit 1451
3. Präcipitatlösung beobachtet 306
4. 1% Thornitrat 132
5. Refraktionssumme, berechnet aus den Endprodukten (2. + 3. − 4.) 1625
6. Differenz zwischen 1 und 5 . . . . −5

Skizziert wird die detaillierte Rechnung durch die Formeln:

Refraktionssumme der Ausgangskomponenten

$$\frac{IW(\text{Antigen}) + IW(\text{Antiserum})}{2}, \qquad (1)$$

Refraktionssumme der Endprodukte (2)

$$\frac{IW(\text{überst. Flüssigkeit.}) \cdot v_1 + IW(\text{Präcipitatlösung}) \cdot (v_1 + v_2) - IW(\text{Lösungsmittel}) \cdot v_1}{v_1 + v_2},$$

wobei: v_1 = Volumen der überstehenden Flüssigkeit (im obigen Versuch 19,67 ccm),

v_2 = Volumen des Präcipitates (im obigen Versuch 0,33 ccm),

$v_1 + v_2$ = Reaktionsvolum = 20 ccm.

Die Genauigkeit der Volumsbestimmungen wurde durch Parallelversuche ermittelt; der maximale Fehler betrug ± 0,02 ccm. Fehler dieser Größenordnung kommen aber in den Endresultaten nicht mehr störend zum Ausdruck, wie man sich durch Rechnung mit willkürlich angenommenen Volumina, die von den tatsächlich ermittelten um den angegebenen Fehler abweichen, leicht überzeugen kann.

Auch bei dieser Methodik begegnen wir der völligen Unabhängigkeit der Schlußdifferenzen von den verwendeten Antigenkonzentrationen, wie folgender Reihenversuch lehrt:

Antiserum	Antigen-Konzentration	Differenzen		
		4 cm-Kammer		2 cm-Kammer
$^1/_5$ Antimenschenserum v. Kaninchen G_{43}	1 : 50	−5	+12	+9
	1 : 100	+12	—	+12
	1 : 200	—	—	+5
	1 : 400	+22	—	+8

Ergebnisse des indirekten Verfahrens.

Fassen wir die mit diesem Verfahren in sehr zahlreichen Einzelversuchen gewonnenen Resultate zusammen, so können wir sagen:

Bei Auflösung der nichtisolierten Präcipitate mit hochgradig verdünnter Natronlauge verhielt sich die Refraktion genau so, als ob man irgendeine nicht ausgeflockte Serumverdünnung gleicher Konzentration mit der verdünnten NaOH vermengt hatte.

Es ergaben sich Glattwerte oder kleinere Minuswerte, nie die nach den Hypothesen von Calcar und P. Hirsch zu fordernde Erhöhung.

Bei Auflösung nichtisolierter Präcipitate mit Thornitrat und bei Verwendung einer stark sauer reagierenden Thorsalzlösung bekamen wir Minuswerte; wurden die Präcipitate vor der Auflösung isoliert und bewerkstelligte man die Auflösung in schwach sauren Thorsalzlösungen, so resultierten Glattwerte innerhalb der Fehlerbreite ± 10, doch hatte die Differenz mit einer einzigen Ausnahme ein positives Vorzeichen.

Wir haben uns nun selbst den Einwand gemacht, daß man in Anbetracht des stark refraktionsvermindernden Einflusses saurer Thorsalzlösungen größere Minuswerte als die tatsächlich erzielten fordern könnte und daß man daher ein gewisses Anrecht zu konstruieren vermag, aus den Glattwerten und den relativ zu kleinen Minuswerten doch noch auf eine Refraktionserhöhung zu schließen. Diesem Einwand dadurch zu begegnen, daß wir die Refraktionsverminderung durch Thorsalze einfach mit einem bestimmten Betrag in Rechnung stellten, war aus mehrfachen Gründen unstatthaft. Erstens schwankte diese Refraktionsabnahme auch unter gleichen Verhältnissen nicht unbeträchtlich und zweitens darf man von den Versuchen mit Serum keinen Rückschluß machen auf die Refraktionsabnahme mit Präcipitaten; wie die Refraktion durch Lösung von Präcipitaten in sauren Thorsalzen reduziert wird, läßt sich aber kaum feststellen.

Jedenfalls war der Gedanke an eine „maskierte" Refraktionserhöhung angesichts der ganz eindeutigen Experimente mit $^{n}/_{100}$-NaOH als Lösungsmittel mit völliger Sicherheit auszuschließen.

Alle Verfahren, bei welchen das Präcipitat wieder aufgelöst wird, arbeiten aber — das muß zugegeben werden — mit einem seiner Natur nach nicht ganz bekannten und daher sehr unangenehmen Faktor: der Einführung eines Lösungsmittels in das Gemisch von Antigen und Antikörper. Daraus müssen Fehlerquellen entspringen, die bei $^{n}/_{100}$-NaOH unbedeutend, bei $^{n}/_{10}$-NaOH und 1 proz. Thorsulfat erheblicher und bei 1 proz. Thornitrat endlich sehr groß sind.

Das Schwergewicht bei der Beurteilung der ganzen Angelegenheit muß daher auf ein Verfahren gelegt werden, welches jedes Lösungsmittel entbehrlich macht.

2. Direkte interferometrische Beobachtung der Immunpräcipitation.

Wenn die Immunpräcipitation die Folge einer mit Refraktionserhöhung einhergehenden Antigenverdauung durch Abwehrfermente des Immunserums wäre, so müßte die Refraktionserhöhung auch eintreten, wenn man die Flockung durch Antigenüberschuß verhindert. Denn die Refraktionserhöhung durch Wirkung eines Fermentes z. B. Trypsin wird durch den Überschuß des fermenteszliblen Substrates nicht nur nicht gehindert, sondern vielmehr gesteigert. Wir wollen nicht darauf eingehen, ob sich das Phänomen der „unteren Hemmungszone" der Präcipitation mit den Fermenthypothesen von van Calcar und P. Hirsch überhaupt verträgt; es sei eben nur betont, daß sich die Refraktionserhöhung, über welche Hirsch, Köhler, Langenstrass u. a. berichtet haben, auch bei ausbleibender Flockung zeigen müßte, und diese Überlegung veranlaßte uns, die Immunpräcipitation „sine praecipitatione", d. h. in der unteren Hemmungszone direkt interferometrisch zu untersuchen.

Weiters liegen Beobachtungen von Marc vor, der schon 1911 sah, daß kolloidale Lösungen, z. B. länger aufbewahrte Gelatinelösungen, bei spontan eintretender Trübung merkwürdigerweise zunächst keine Verminderung ihrer Refraktion erfahren. In der Folge haben noch Walpole, Wiegner und Wintgen auf die Möglichkeit des Gleichbleibens der Refraktion bei Dispersitätsveränderungen kolloiddisperser Systeme hingewiesen. Ähnliche Wahrnehmungen machte Doerr, wenn er Serum mit Thorsalzlösungen in solchen gegenseitigen Mengenverhältnissen vermischte, daß homogene, stabile Trübungen leichten Grades (Opalescenzen) auftraten; der Refraktionswert solcher Gemenge entsprach vollkommen dem theoretischen, mit der Mischungsformel berechneten Sollwert. Auch wir können diese Erscheinung bestätigen; an der Richtigkeit der Angaben von Marc, Walpole, Wiegner und Doerr ließen systematische Untersuchungen an dauernden oder transitorischen Trübungen leichter, ja sogar mittlerer Grade keinen Zweifel aufkommen. Es mußte daher eine direkte Beobachtung der Immunpräcipitation mit dem Interferometer nicht nur bei klarbleibenden Präcipitinogen-Präcipitingemischen (untere Hemmungszone), sondern auch bei allmählich eintretender Flockung möglich und theoretisch gerechtfertigt sein.

Es liegt auf der Hand, daß ein derartiges Verfahren den ganzen Modus procedendi auf die denkbar einfachste Form reduziert. Die Wirkung des Auflösungsmittels fällt ganz weg, Manipulationen und Berechnungen nehmen mit einem Schlage eine Gestalt an, die alle Fehler a limine ausschließt. Auf diesem Wege mußte sich die von Hirsch und Langenstrass angegebene Refraktionserhöhung in derselben Manier nachweisen lassen wie bei der Zerlegung, welche Harnstoff in der Interferometerkammer durch Urease erfährt, denn die Präcipitation trat bei unseren Immunsera innerhalb weniger Minuten ein; soll ein mit Refraktionserhöhung einhergehender Vorgang als Ursache der Immunpräcipitation anerkannt werden, so muß er notwendigerweise mindestens ebenso rasch verlaufen wie die von ihm hervorgerufene Flockung. Bei der interferometrischen Messung der Ureasewirkung konstatierten wir ja 1. schon bei der allerersten Ablesung (nach 30 Sek.) einen gegenüber dem berechneten Sollwert deutlich erhöhten IW. des Gemenges Urease-Harnstoff und 2. daran anschließend einen raschen, im Interferometer gut verfolgbaren, weiteren Anstieg der Refraktion.

Analoge Befunde konnten wir jedoch bei der Immunpräcipitation nie erheben.

Bei direkter Beobachtung des Ablaufes der Immunpräcipitation in der Interferometerkammer ohne Anwendung von Auflösungsmitteln haben wir nicht ein einziges Mal eine Refraktionserhöhung festgestellt.

Die Präcipitationen wurden mit 4 verschiedenen Immunsera (1 Antimeerschweinchenserum M_2 und 3 Antipferdesera H_{31}, H_{39} und S_{54}) ausgeführt. Die Antigenkonzentrationen wechselten, das präcipitierende Immunserum wurde in solchen Mengen zugesetzt, daß sich die Konzentration im Gesamtvolum des Reaktionsgemisches wie üblich auf 1 : 10 belief. Die Ausmessungen erfolgten sowohl in der 4 cm- wie in der 2 cm-Kammer und lieferten gleichsinnige Resultate.

Jedes Experiment wurde so durchgeführt, daß das erzielte Ergebnis als **vierfacher Beweis** für die Richtigkeit der Behauptung gelten konnte, daß sich die Refraktion bei der Immunpräcipitation nicht ändert.

1. Unmittelbar nach dem Vermengen entsprach nämlich der IW. des Antigen-Antikörper- (Serum-Antiserum-) Gemenges

dem Sollwert, d. h. jenem Wert, der ohne chemische Umsetzung der beiden Komponenten zu erwarten war.

2. Vom Augenblick der ersten Ablesung im Interferometer bis zum Eintritt der Trübung änderte sich die Refraktion nicht. Gerade in dieser Phase müßte aber die Refraktionserhöhung stattfinden, wenn sie als optischer Ausdruck eines Prozesses gelten soll, welcher die Flockung verursacht.

3. Vom Beginne der Trübung an bis zu einem oft schon ziemlich weit fortgeschrittenen Stadium der Flockung blieben die anfänglich eingestellten Streifen des Interferenzspektrums an Ort und Stelle, solange als die zunehmende Trübung überhaupt noch eine Ablesung gestattete. Die Refraktion änderte sich somit nicht einmal in den ersten Stadien der Agglomeration der unlöslich gewordenen Teilchen, sondern erst mit dem Eintritte der Sedimentierung und dann im Sinne einer Abnahme.

4. Das Gleichbleiben der Refraktion während der Zunahme der Trübung kann nicht darauf zurückgeführt werden, daß sich eine hypothetische Refraktionserhöhung durch Abbau und eine Refraktionserniedrigung durch Ausfällen des Eiweißes gegenseitig aufheben. Einerseits wissen wir, daß andere Eiweißfällungen, bei denen Fermentationen ausgeschlossen sind, in ihren ersten Stadien die Refraktion nicht alterieren (Marc, Walpole, Wiegner, Doerr, unsere ad hoc angestellten Experimente) und andererseits haben wir es ja in der Hand, das Präcipitat durch Zusatz von $^{n}/_{100}$-NaOH wieder bis zur homogenen Lösung zu dispergieren: dann müßte die supponierte Refraktionserhöhung zum Vorschein kommen, was aber nicht zutrifft. Nach Klärung des trüben Reaktionsgemisches durch $^{n}/_{100}$-NaOH entsprach stets der beobachtete Wert dem berechneten bis auf jene kleinen Minusdifferenzen, die bei jeder Einwirkung von Lauge auf Serumeiweiß zustande kommen. Abgesehen davon ist ja die Annahme, daß sich die hypothetische Refraktionserhöhung und eine Refraktionserniedrigung durch Eiweißflockung in jedem Zeitmoment des spezifischen Präcipitationsvorganges Null für Null aufheben, so unwahrscheinlich, daß sie eigentlich überhaupt nicht diskutiert zu werden braucht.

Für die ausführliche Wiedergabe sei ein Versuch gewählt, in dem die spezifische Präcipitation so verzögert eintrat und ablief, daß ihre optische Untersuchung durch längere Zeit hindurch verfolgt werden konnte.

Versuch: Direkte interferometrische Untersuchung einer Immunpräcipitation ohne Anwendung von Auflösungsmitteln: Temperatur 17,5° C, Vergleichsflüssigkeit 1,8% NaCl.

I. Beobachtung am Beginn des Versuches (vgl. Punkt 1).

Interferometrierte Flüssigkeiten	Interferometerwerte 4 cm-Kammer	2 cm-Kammer
1. $^1/_5$ Antipferdeserum (S_{54})	1138	563
2. $^1/_{100}$ Pferdeserum	421	208
3. 1. + 2. $\overline{aa}$, berechnet	779	385,5
4. 1. + 2. $\overline{aa}$, beobachtet	768	384
5. Differenz zwischen beobachtetem und berechnetem Wert	—11	—1,5

II. Beobachtung vom Vermengen bis zur Ausflockung (vgl. Punkt 2 und 3).

Seit dem Vermengen abgelaufene Zeit in Minuten	Aussehen des Reaktionsgemisches	Interferometerwerte 4 cm-Kammer	2 cm-Kammer
0	klar	779*)	385,5
2		771	384
3	.	768	385
4	„	—	384
6	fast klar	769	—
7	beginn. Trübung	767	383
10	„	767	—
13	zunehm. Trübung	unleserlich	384
23	kräftige Trübung	„	384
30	Flockung	„	unleserlich

*) Ablesung vor völligem Temperaturausgleich.

III. Wiederauflösung der Trübung mit $^n/_{200}$-NaOH (vgl. Punkt 4).

	2 cm-Kammer
4. Serum-Antiserumgemisch	384
6. $^n/_{200}$-NaOH	85
7. 4. + 6. $\overline{aa}$, berechnet	234,5
8. 4. + 6. $\overline{aa}$ ergibt eine klare Lösung mit dem IW. . .	221
9. Differenz zwischen beobachtetem und berechnetem Wert	—13

Vergleichsweise seien nun noch die Differenzen zwischen beobachtetem IW. und berechneten Sollwerten gegenübergestellt, wie sie sich ergeben:

a) Bei dauerndem Ausbleiben der Trübung,

b) bei verzögerter und

c) bei sehr rascher Präcipitation.

Unterschiede, welche durch die verschiedene Reaktionsgeschwindigkeit bedingt sein konnten, traten nicht zutage. Niemals konnte eine spätere Erhöhung des erstabgelesenen Wertes konstatiert werden, auch nicht bei der Ausdehnung der Beobachtungszeit über eine Stunde.

Bez. d. Immunserums	Antigen-konz.	Verlauf der Präcip.	Differenzen zw. beob. u. Sollwert 4 cm-Kammer	2 cm-K.	0,5 cm-K.
Antimeerschweinchenserum M_2	$^1/_{10}$	keine Flockung	+11 +1	−1	—
Antipferdeserum .... H_{31}	$^1/_{10}$	„ „	—	+0,7	+5,5
„ H_{30}	$^1/_{10}$	verzög. „	—	−11	−10
Antimeerschweinchenserum M_2	$^1/_{100}$	rasche „	+14 −5	0	—

Schlußfolgerungen.

Die mit dem hochempfindlichen Interferometer durchgeführten Refraktionsbestimmungen bei Immunpräcipitationen haben mit dem alten, der Methodik von Hirsch nachgebildeten, aber vielfach modifizierten indirekten Verfahren zum Teil absolute, zum Teil annähernde Übereinstimmung der beobachteten Refraktion der präcipitierten Antigen-Antikörpergemenge mit den berechneten Sollwerten („Gemischtwerten“) ergeben. Die Abweichungen waren nach Zahl und Größe gering und beruhten, wie die darauf gerichteten Kontrolluntersuchungen ergaben, entweder auf technischen Fehlern oder auf der Einwirkung der zur Lösung der Präcipitate verwendeten Dispersionsmittel.

Die Messungen mit dem neuen direkten Verfahren ergaben ausnahmslos eine nahezu absolute, d. h. die unter den Bedingungen der Methodik überhaupt erreichbare Übereinstimmung; die Refraktion der Präcipitinogen-Präcipitingemenge hatte also den Wert, den man erwarten muß, wenn keine chemische (molekulare) Umsetzung stattfindet. Nie wurde eine Zunahme der Refraktion mit fortschreitender Reaktionszeit beobachtet.

Damit steht fest, daß die **Reaktion zwischen Eiweißantigen und präcipitierendem Immunserum** in der ersten bis zur Flockung reichenden Phase **die Refraktion nicht ändert;** die interferometrische Untersuchung erbringt keinen Beweis für die hypothetische Auffassung der Immunpräcipitation als einer „Abwehrfermentreaktion“.

Bei gleichbleibender Refraktion ist nach theoretischer Überlegung und nach den Ergebnissen des Experimentes allerdings sowohl ein weitgehender Abbau wie ein Ausbleiben jeglichen chemischen Geschehens möglich. Die Entscheidung dieser Alternative ist jedoch mit Hilfe des Interferometers unmöglich; sie stand auch nicht zur Diskussion, vielmehr handelte es sich nur darum, ob die Aussage, daß Immunpräcipitationen mit Refrak-

tionserhöhungen verknüpft sind (Hirsch, Langenstrass), zu Recht besteht oder nicht.

Da nun ein Beweis für einen Abbau auf refraktometrischem (interferometrischem) Wege nicht erbracht werden konnte, entbehrt die Hypothese der fermentativen Spaltung der Eiweißantigene durch ihre Antikörper jeder tatsächlichen Stütze. Die bisherigen Anschauungen über das Wesen und den Mechanismus der Immunpräcipitation wie auch der Anaphylaxie bestehen zu Recht. Ihre Deutung als rein physikalische Prozesse gewinnt durch die Resultate der Interferometrie bedeutend an Boden. Auf dieses Kapitel gedenken wir an anderer Stelle näher einzugehen.

Literatur.

Van Calcar, R. P., Dialyse, Eiweißchemie und Immunität. Doesburgh, Leiden und Barth, Leipzig 1908. — Bordet, J., Traité de l'immunité dans les maladies infect. Masson Paris 1920. — Hirsch, P., Fermentstudien. Fischer, Jena 1917. — Hirsch, P., Fermentforschung **2**, 290. 1919. — Hirsch, P., Zeitschr. f. angew. Chemie **33**, 269. 1920. — Hirsch, P., Jenaische Zeitschr. f. Naturw. **56**. 1920. — Langenstrass, Immunochem. Studien von P. Hirsch III. Fermentforschung **3**, 1. — Doerr, R., Kolloid-Zeitschr. **27**, 277. 1920. — Haber und Loewe, Zeitschr. f. angew. Chemie **23**, 1393. 1910. — Loewe, Zeitschr. f. Instrumentenk. **30**, 321. 1910. — Loewe, Chemiker-Zeit. **45**, 405. 1921. — Barus, C., Publications of the Carnegie Institution of Washington 1911, 1912, 1913, Nr. 149 und 1915, Nr. 229. — Marc, Chemiker-Zeit. **36**, 357. 1912. — Schmeel, Diss. Freiburg 1915. — Gans und Bose, Zeitschr. f. Instrumentenk. **36**, 136. 1916. — Pregl, Zeitschr. f. physiol. Chem. **45**, 166. 1905. — Herlitzka, Kolloid-Zeitschr. **7**, 251. 1910. — Frei, ebenda **6**, 1913. 1910. — Walpole, ebenda **13**, 241. 1913. — Wintgen, Kolloidchem. Beih. **7**, 251. 1915. — Oppenheimer und Aron, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **4**, 279. 1904. — Obermayer und E. P. Pick, ebenda **7**, 331. 1905. — Oppenheimer, C., Die Fermente und ihre Wirkungen. Vogel, Leipzig 1913. — Rona und Michaelis, diese Zeitschr. **31**, 343. 1911. — Rona in Abderhaldens Handbuch, Biochemische Arbeitsmethoden, Bd. 8, S. 301. — Olsen und Goette, diese Zeitschr. **112**, 189. 1920. — Wiegner, Kolloid-Zeitschr. **20**, 7. 1917.

Bezüglich der sonstigen zitierten Literatur siehe den demnächst erscheinenden Artikel: R. Doerr, Die Anaphylaxieforschung im Zeitraum von 1914—1921. Weichhardts Ergebnisse der Hygiene, Bakteriol., Immunitätsforschung und exper. Ther. **5**, 1921.

Über die Wechselbeziehungen zwischen Blutplasma und Gewebeflüssigkeiten, insbesondere Kammerwasser und Cerebrospinalflüssigkeit[1]).

I. Der Zuckergehalt und die Frage des gebundenen Zuckers.

Von

J. de Haan und **S. van Creveld.**

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Groningen.)

(Eingegangen am 19. Juli 1921.)

Einleitung.

Die Beziehungen zwischen Blutstrom und Lymphestrom, die Wechselwirkung zwischen Blut und Gewebeflüssigkeiten sind noch immer Objekt lebhafter Diskussion. Zwar ist festgestellt worden, daß der Blutdruck nicht die einzig wirksame filtrierende Kraft ist für die Lymphbildung; es ist dies von vornherein auch darum unmöglich, weil im lebenden Körper die Abhängigkeitsbeziehungen zwischen den verschiedenen Lebenserscheinungen nirgends derart sich gestalten, daß einzelne nur Ursache, andere nur Folge sind. In dem letzten Jahrzehnt haben sich die Asherschen Anschauungen über den wichtigen Anteil der Arbeit der Gewebszellen an der Lymphbildung immer mehr Bahn gebrochen; es wäre jedoch verfehlt, wenn man darum die wichtigen Fragen, vor welche die Zellarbeit uns stellt, mit dem Namen vitale Wirkung und Sekretion bei Seite liegen ließe. Ist es ja Zweck aller Untersuchung, die Resultate letzterer Arbeit derart zu analysieren, daß die dabei wirksamen Kräfte uns möglichst einfach vor Augen stehen. Inwieweit spielen dabei Kräfte wie Filtration, Diffusion, Adsorption usw. eine Rolle? Es ist wohl unzweifelhaft, daß dem Blute hier vielfach eine führende Rolle zukommt. Die Weise,

---

[1]) Eine vorläufige Mitteilung über diesen Gegenstand erschien in dem „Zittingsverslag Koninkl. Academie van Wetensch." vom 26. III. 1921.

in der die Blutzusammensetzung in den verschiedenen Körperflüssigkeiten sich wiederfindet, ist an erster Stelle eine Permeabilitätsfrage einer oder mehrerer trennenden Membrane, und zweitens durch die Arbeit beeinflußt, welche die Zellen, sei es als deutliche Membranen geordnet, sei es jede für sich, im fortwährenden Stoffwechselbetrieb ausüben. Wo diese Membranarbeit überaus groß ist, manifestiert sich dies in einer völlig abweichenden Zusammensetzung der Flüssigkeiten, welche an der anderen Seite der Membran hervorquellen; der Anteil der direkten Diffusion tritt völlig in den Hintergrund; hier gibt es eine reine „Sekretion": Die chemische Zusammensetzung des Magensaftes, des Harnes, der Galle usw. ist der Ausdruck desjenigen, was die betreffenden Organzellen auf den Reiz vom Blute her liefern.

In den sogenannten Gewebeflüssigkeiten jedoch können die von der Zellenarbeit bewirkten Abänderungen nicht so schroff hervortreten, indem sie fortwährend wieder vom Blute her ausgeglichen werden: Die gebildete Flüssigkeit wird hier nicht fortgeschafft, sondern bleibt mit dem Blute fortwährend in engster Beziehung.

Wenn dennoch in chemischer Hinsicht Verschiedenheiten diesseits und jenseits von den Gewebe und Blut trennenden Membranen angetroffen werden, so müssen dieselben von 2 Faktoren beherrscht werden. Erstens können sie der Ausdruck sein einer überaus starken modifizierenden Gewebsarbeit; zweitens kann auch die abschließende Wirkung der Membran für bestimmte Stoffe eine nahezu vollkommene sein; auch im letzten Falle wird schon ein ziemlich geringfügiger Unterschied in der Produktions- oder Verbrauchsschnelligkeit dieser Stoffe an beiden Seiten der Membran eine größere Differenz in der Konzentration derselben hervorrufen. An eine solche Undurchgängigkeit werden wir an erster Stelle denken, wenn wir den großen Unterschied im Eiweißgehalt zwischen Blut und Lymphe betrachten.

Von diesem chemischen Gesichtspunkte aus haben wir uns mit Untersuchungen über die Verhältnisse zwischen dem Blute und 2 typischen Organflüssigkeiten befaßt, dem Kammerwasser der vorderen Augenkammer und der Cerebrospinalflüssigkeit, welche beide in leichter Weise rein erhalten werden können.

Bis zum jetzigen Tage wird meistens für diese Flüssigkeiten ein bestimmter Entstehungsort angegeben; die meisten Unter-

sucher sprechen nämlich von einer Sekretion, andere von einer Filtration durch die Processus ciliaris für das Auge und durch den Plexus chorioideus für das Gehirnwasser. Untersuchungen der letzten Zeit (z. B. C. Hamburgers für das Auge) sprechen einen berechtigten Zweifel aus, ob es hier unter normalen Verhältnissen eine ganz bestimmte Bildungsmembran gibt, und weiter, ob hier von einer nennenswerten Flüssigkeitsbewegung die Rede sein kann; allem Anschein nach sind es vielmehr statische Flüssigkeiten, wobei der Diffusion eine größere Rolle zukommt als der Wasserbewegung infolge des Blutdruckes. Wir wollen uns hier nicht weiter mit der schwierigen Frage befassen, welches Verhältnis zwischen dem Drucke der gebildeten Flüssigkeit und dem Blutdrucke besteht. Noch vor kurzem hat Becht[1]) betont, daß die Lösung dieses Problems äußerst schwierig ist; dieser Autor kommt auf Grund zahlreicher Experimente zu der Schlußfolgerung, daß betreffs der Cerebrospinalflüssigkeit die zumal von Halliburton und Dixon[2]) hervorgehobenen Argumente, welche eine aktive vom Blutdruck unabhängige Sekretion beweisen sollten, sich ebenso leicht in mechanischer Weise erklären lassen.

Die chemische Zusammensetzung der beiden Flüssigkeiten ist sowohl für die mechanische als für die „sekretorische" Erklärung als Beweismaterial verwendet. Auf Grund der großen Übereinstimmung in der Zusammensetzung ist wiederholt betont worden, daß eine enge Beziehung mit dem Blute bestehen soll; von anderen ist jedoch, insbesondere für das Gehirnwasser, aber auch für das Kammerwasser, auf bestimmte Diskongruenzen mit dem Blute hingewiesen (Verschlossensein für Farbstoffe, Medikamente, Salze (Jodiden) usw.), welche auf vitale Eigenschaften der Membran bezogen werden. In einer zweiten Mitteilung hoffen wir diese Frage näher ins Auge zu fassen, und über das All- oder Nichtverschlossenbleiben der Membran für derartige Stoffe zu berichten.

In dieser ersten Mitteilung haben wir uns mit der Durchgängigkeit für einen ganz physiologischen Stoff beschäftigt und zwar mit der Glucose.

Wir haben untersucht, inwieweit der Zuckergehalt der obengenannten Gewebeflüssigkeiten in normalen Verhältnissen von dem im Blute verschieden ist; zweitens haben wir den Blut-

[1]) Americ. Journ. of physiol. **51**, 1. 1920.
[2]) Journ. of physiol. **47**, 215. 1913; **48**, 128. 1914.

zuckergehalt für kurze Perioden künstlich abgeändert. Die Schnelligkeit, womit dieser Wechsel von den Gewebeflüssigkeiten befolgt wurde, konnte als Maß dienen für die Durchlässigkeit der betreffenden Membranen für Glucose, und dadurch ließe sich ein Anhaltspunkt gewinnen, inwieweit eine geringe Diffusibilität für etwaige Verschiedenheiten zwischen dem Blute und den Gewebeflüssigkeiten verantwortlich gemacht werden konnte.

An erster Stelle haben wir als Leitmotiv die meist augenfällige Eigenschaft dieser Flüssigkeiten, nämlich ihr minimaler Gehalt an Eiweiß und anderen Kolloiden gelten lassen. Durch die Entwicklung der physikalischen und der Kolloidchemie brauchen wir wenigstens für dieses Zurückhalten von Kolloiden nicht mehr den Ausdruck „vitale Eigenschaft" zu verwenden; gibt es ja bei der Dialyse und der Ultrafiltration Beispiele von nichtlebenden Membranen, welche ebenso für Kolloide undurchgängig sind. Die Cerebrospinalflüssigkeit ist dann auch von Mestrezat[1]), das Kammerwasser von Magitot[2]) als ein Dialysat des Blutes betrachtet, wo die vorhandenen Stoffe nur nach Maßgabe ihrer verschiedenen Diffusibilität vorhanden seien.

Auch wir haben uns das Ziel gestellt, zu untersuchen, inwieweit sich diese Flüssigkeiten wie ein Ultrafiltrat oder besser wie ein Dialysat verhalten. Was den Zucker anbelangt, so hatten wir in dieser Hinsicht einen speziellen Anhaltspunkt. Konnte ja einer von uns[3]) nachweisen, daß beim Ultrafiltrieren von Blutserum ein nicht unerheblicher Teil des Zuckers auf dem Filter zurückbleibt. Da der Zustand, in welchem die Glucose im Blute vorhanden ist, in letzterer Zeit vielfach der Gegenstand einer Diskussion gewesen ist, möchten wir zuerst eine kurz gefaßte Übersicht von den Änderungen, welche die Auffassungen über die Verteilung und Bindung des Blutzuckers in den letzten Jahren mitgemacht haben, hier mitteilen; waren ja selbstredend diese Auffassungen für unsere Untersuchung von größter Wichtigkeit.

Neuere Ergebnisse über den Blutzucker.

1. Untersuchungen der letzten Jahre haben es wohl klargelegt, daß beim Menschen und den bekannten Laboratoriums-

[1]) Le liquide céphalo-rachidien 1912.

[2]) Ann. d'oculist. **154.** 1917.

[3]) S. van Creveld, Verslag Physiologendag 16. XII. 1920, Amsterdam. Nederlandsch. Tijdschr. v. Geneesk. 2. Hälfte, 783. 1921.

tieren (Frosch, Kaninchen) im strömenden Blute die roten Blutkörperchen höchstens winzige Quantitäten an Glucose enthalten können und wahrscheinlich völlig zuckerfrei sind[1]). Zugleich haben diese Untersuchungen gelehrt, daß schon durch geringfügige Manipulationen, wie Defibrinieren, Gerinnung, Zusatz von gerinnungshemmenden Substanzen eine Änderung der Permeabilität stattfindet, wodurch sehr schnell ein erheblicher Teil des Plasmazuckers in die Blutkörperchen überwandert.

Aus diesem Grunde sind eigentlich alle früheren vergleichenden Bestimmungen des Zuckers im Blute und anderen Organflüssigkeiten nur von sehr beschränktem Werte, indem dabei diesen Fakten nicht genügend Rechnung getragen wurde. Es wurde immer das Gesamtblut oder ein Blutplasma oder auch Blutserum untersucht, dessen Zuckergehalt mehr oder weniger geringer war als im strömenden Plasma. Wo die Größe der Abnahme sehr verschieden ausfällt, ist es nicht möglich, dafür eine Korrektion anzugeben. Und selbstredend kommt nur der wahre Gehalt des Plasmas an Zucker für vergleichende Untersuchungen mit anderen Organflüssigkeiten in Betracht. Nur mit dieser wichtigen Einschränkung konnten wir die Angaben der Literatur, welche wir im weiteren mitteilen werden, verwenden. Und selber mußten wir möglichst dafür Sorge tragen, daß wir nur den richtigen Plasmawert und nichts anderes bestimmten.

2. Dann ist der Blutzuckergehalt eines Tieres keine konstante Größe, sondern sehr erheblichen Schwankungen in kurzer Zeit (durch Nahrung, Schrecken usw.) ausgesetzt; es gibt also für ein bestimmtes Tier keinen festen Blutzuckerwert, und möglichst gleichzeitige Bestimmungen im Blute und den anderen Körperflüssigkeiten konnten deshalb für unseren Zweck nur in Betracht kommen.

3. Das dritte in Betracht kommende Problem haben wir als unseren Ausgangspunkt schon gestreift: Gibt es einen sogenannten „gebundenen Blutzucker"? Steht ein größerer oder kleinerer Teil des Blutzuckers im engeren Verhältnis zu einem oder mehreren der Kolloide des Plasmas? — Die Frage des Bestehens eines

[1]) Siehe u. m. R. Brinkman und E. van Dam, Arch. internat. de physiol. **15**, 105. 1919. — S. van Creveld und R. Brinkman, Zittingsverslag Koninkl. Acad. van Wetensch., 17. Dez. 1920. Daselbst auch weitere Literaturangaben.

Sucre virtuel (Lépine u. a.) schien durch die Untersuchungen von Abel[1]), von Hess und Mc Guigan[2]) und von Rona und Michaelis[3]) gelöst in dem Sinne, daß der totale Plasmazucker frei im Plasma vorhanden sei. Der Befund van Crevelds, zur selben Zeit auch von Rusznyak[4]) beschrieben, zeigt jedoch, daß dies nicht zutreffen kann; beide fanden, daß ein erheblicher Teil des Zuckers im Serum nicht ultrafiltrierbar ist[5]). Es besteht also ein Unterschied in der Größe der totalen Reduktion (der Zucker wurde mit der letzten Bangschen Methode bestimmt) des Plasmas (Serums) und seines Ultrafiltrates, sei es, daß dieser wirklich von Glucose oder von anderen reduzierenden Stoffen herrührt. Daß weder v. Hess und Mc Guigan nach der Methode der Vivodiffusion von Abel, noch Michaelis und Rona ein damit übereinstimmendes Resultat erhielten, ist nicht wunderlich. Haben doch v. Hess und Mc Guigan mit ihrem Vivodialysat den Zuckergehalt des mittels NaF erhaltenen Blutplasmas verglichen. Aus dem auf S. 193 gesagten folgt aber, daß der Zuckerwert des Fluoridplasmas höchstwahrscheinlich niedriger ausfallen wird als im strömenden Blutplasma. Wenn also diese Autoren für den Zuckergehalt des Vivodialysates ungefähr denselben Betrag finden wie im Fluoridplasma, so sollte man aus diesem Befunde eher auf einen höheren Gehalt im Plasma des Körpers, d. h. also auf eine Bindung eines Teiles des Zuckers schließen müssen. Und was die Ergebnisse Michaelis und Ronas anbelangt, so garantiert die Methodik eines 48stündigen Dialysierverfahrens sicher weniger das Bestehenbleiben der Verhältnisse des strömenden Blutes als die viel schneller wirkende Ultrafiltration. Die beim Ultrafiltrieren erhaltenen Unterschiede waren meistens so erheblich,

[1]) Abel, Rowntree and Turner, Journ. of pharmacol. a. exp. therap. **5**, 275 u. 611. 1914.

[2]) Ibidem **6**, 45. 1914.

[3]) Diese Zeitschr. **14**, 476. 1908.

[4]) Diese Zeitschr. **113**, 52. 1921.

[5]) Es möge in diesem Zusammenhange noch eine Mitteilung von Hamburger und Brinkman (diese Zeitschr. **88**, 103. 1918) Erwähnung finden. Diese Autoren fanden im hiesigen Institut keine Differenz im Zuckergehalt zwischen Serum und Ultrafiltrat. Es handelte sich hier jedoch nur um vorläufige Experimente bei einer Untersuchung, deren Hauptzwecke in anderer Richtung lagen. Zweifelsohne würden auch Hamburger und Brinkman bei fortgesetzten Versuchen die meist vorhandene erhebliche Differenz konstatiert haben.

daß an Versuchsfehler (Adsorption durch das Filter, Volum des Eiweißes des Serums) nicht gedacht werden konnte; auch bleibt der Unterschied nicht nur für die ersten, sondern auch für die später filtrierten Portionen bestehen. Aus Tabelle I ersieht man, daß z. B. beim Rinde etwa $^1/_3$—$^1/_4$ des Totalzuckers gebunden ist.

Tabelle I.

Zuckergehalt des Rinderserums	Zuckergehalt des Ultrafiltrates von Rinderserum	Differenz	Mittlere Differenz
0,139	0,065	0,074	
0,150	0,086	0,064	
0,136	0,060	0,076	0,064
0,128	0,072	0,056	
0,130	0,081	0,049	

Wir können vorläufig nicht mit Bestimmtheit sagen, daß der gebundene Teil der Stoffe, welche die Totalreduktion bewirken, wirklich Glucose betrifft. Nach den Untersuchungen von Ege[1]) jedoch wäre hier kaum an eine andere Möglichkeit zu denken; hat ja dieser Forscher festgestellt, daß von der Totalreduktion nur ein winziger Teil auf Rechnung der Restreduktion gestellt werden darf. Wir werden dann auch den nichtultrafiltrierbaren Teil der Totalreduktion hier weiter mit dem Namen „gebundener Zucker“ bezeichnen. Auch andere Untersucher haben neulich auf die Wahrscheinlichkeit des Bestehens eines gebundenen Zuckers hingewiesen, sei es auch nicht auf zwingende Gründe hin. Kleiner[2]) verweist auf diese Möglichkeit, da er feststellte, daß der Zucker aus diabetischem Blute langsamer dialysierte als aus normalem, nachdem im letzteren durch Zuckerzusatz derselbe Zuckergehalt hergestellt worden war als im ersten; und Allen[3]) meint darauf schließen zu dürfen, weil eine hypodermale Gabe von Glucose keine Glucosurie verursacht, während nach intravenösem Verfahren letztere sofort auftritt; in ersterem Falle sollte der Zucker auf dem Wege zum Blute von den Gewebezellen in eine Bindung überführt worden sein.

Da Kammerwasser und Cerebrospinalflüssigkeit fast alle Eigenschaften eines natürlichen Ultrafiltrates zeigen, war es für

[1]) Diese Zeitschr. **107**, 229. 1920.

[2]) Journ. of biol. chem. **34**, 471. 1918.

[3]) Siehe u. m. Mac Leod, Physiology and Biochemistry in modern Medicine, 1920, S. 693.

uns angezeigt, beim Studium des Zuckerwechsels erst zu erforschen, ob auch hinsichtlich des gebundenen Zuckers diese Flüssigkeiten sich wie ein Ultrafiltrat des Blutes verhalten und ob umgekehrt dadurch die Annahme eines gebundenen Zuckers auch im strömenden Plasma Bestätigung erhalten konnte. Diese Frage werden wir für Kammerwasser und Cerebrospinalflüssigkeit gesondert behandeln, aber erst im kurzen die von uns befolgte Methodik angeben.

Methode.

Als Versuchstiere verwendeten wir Kaninchen. Das Kammerwasser wurde in leichter Weise durch direktes Einstechen eines capillar zugespitzten Glasröhrchens durch die vorher cocainisierte Cornea erhalten. Durch dieselbe Öffnung läßt sich auch nach einigen Minuten das eiweißreiche sekundäre Kammerwasser, das die Kammer schnell wieder anfüllt, entnehmen.

Schwieriger gestaltete sich die Abnahme der Cerebrospinalflüssigkeit. Es handelte sich um einen Vergleich mit dem Blute unter verschiedenen Umständen, und deshalb sollte vor allen Dingen die Entnahme am lebenden Tier stattfinden, und zugleich das letztere infolge dieser Operation nicht sofort eingehen. Eine gewöhnliche Lumbalpunktion ist beim Tiere aber äußerst schwierig. Wir entschlossen uns für eine Operation, welche sich unter Lokalanästhesie (ohne Adrenalin) anstellen läßt: Mittels Medianschnitt werden die Haut und Muskulatur des Nackens beim auf dem Bauch festgebundenen Tier in der Gegend des Atlas gespalten bis auf die Processus spinosi der oberen Halswirbel; darauf wird mit einem der schon erwähnten Glascapillaren das Ligament zwischen Atlas und Hinterhauptsbein durchgestochen, also in der Gegend des 4. Ventrikels; unter langsamem Zurückziehen des Röhrchens sieht man meistens eine genügende Menge der Flüssigkeit schneller oder langsamer in das Röhrchen emporsteigen. Es verdient Empfehlung, erst durchzustechen, nachdem das Tier zuvor in eine Stellung mit gehobenem Hinterkörper gebracht worden ist, damit mit mehr Sicherheit ein positiver Druck der Flüssigkeit erwartet werden kann. Nur selten wurde als Folge der Operation eine vorübergehende Lähmung oder Ataxie beobachtet. Wenn man nach der ersten Entnahme an einer oder 2 Stellen die Haut vorläufig schließt, kann man nach bestimmter Zeit (z. B. unter künstlich veränderten Umständen) die Punktion wiederholen.

Die Blutentnahme wurde möglichst zur selben Zeit als die Entnahme der ebengenannten Flüssigkeit vorgenommen. Wir verfolgten dabei die Methodik, wie sie einer von uns[1]) für das Erhalten eines einwandfreien Blutplasmas verwendet hat: Nach Eröffnung einer Ohrvene durch Punktion füllt man möglichst schnell ein kleines kurz vor dem Versuch paraffiniertes Glasröhrchen von 0,5—0,75 ccm Gehalt mit einigen Tropfen Blut und zentrifugiert unmittelbar während etwa einer Minute; das noch flüssige Plasma

[1]) S. van Creveld, l. c.

wird schnell mit einer paraffinierten Pipette abgesogen und in Doppelproben, ebenso wie das Kammerwasser und die Cerebrospinalflüssigkeit, auf die vorher gewogenen Bangschen Papierstreifen gebracht; diese werden sofort wieder gewogen und dann nach dem zuletzt beschriebenen Bangschen Verfahren der Zuckergehalt bestimmt. Es scheint uns nicht überflüssig, hier zu erwähnen, daß wir mit der Bangschen Methode immer gute Resultate erreichten; es wurde jedoch bei jeder Serienbestimmung zugleich eine Kontrollbestimmung von Glucose 0,1 proz. und auch eine Blindtiterbestimmung der Thiosulfatlösung ausgeführt; solches war nötig, weil der Titer der Thiosulfatlösung nicht konstant bleibt.

In der Mehrzahl der Fälle wurde auch von allen Flüssigkeiten der Eiweißgehalt refraktometrisch mittels des Abbeschen Refraktometers bestimmt.

Eine Adrenalinhyperglykämie wurde durch subconjunctivale Injektion meistens in 2 Tempos, von 0,5—0,75 ccm einer 1 promill. Adrenalinlösung hervorgerufen.

Für die Ultrafiltration kleiner Serummengen verwendeten wir immer ein kleines Ultrafilter nach De Waard [siehe Arch. Néerl. de Physiol. II, 530. 1918].

Zuckergehalt des Kammerwassers.

In der Literatur findet man mehrere Angaben über den Zuckergehalt des Kammerwassers; meistens werden [so u. m. von Osborne[1])] Werte mitgeteilt, welche mit dem des Blutzuckers übereinstimmen. Schon auf S. 194 haben wir mitgeteilt, daß derartige annähernde Angaben für uns keinen Wert hatten, indem der Zuckergehalt des Blutplasmas, womit verglichen werden sollte, niemals einwandfrei bestimmt wurde. Selbst die sehr ausführliche, vorzügliche Arbeit von Ask[2]), in welcher auch vergleichende Untersuchungen über den Zuckergehalt im Blute und Kammerwasser in normalem und künstlich geändertem Zustande mitgeteilt werden, lieferte uns keine Ergebnisse, welche wir ohne weiteres benützen konnten; weder das Prinzip des gebundenen Zuckers, noch die Fehler, welche den Zuckergehalt des untersuchten Blutplasmas herabsetzen könnten, konnten damals berücksichtigt werden. Fernerhin werden wir sehen, daß, wenn man diese Fehler in Anspruch nimmt, die Ergebnisse Asks meistenteils gut mit den unsrigen übereinstimmen, wenn auch dieser Autor zu anderen Schlußfolgerungen kommt. Bei der Kritik unserer Resultate werden wir Gelegenheit haben, darauf näher zurückzukommen.

[1]) Journ. of physiol. **52**, 318. 1919.
[2]) Diese Zeitschr. **59**, 1. 1914.

In Tabelle II finden sich sämtliche vergleichenden Zuckerbestimmungen von Kammerwasser und gleichzeitig erhaltenem Blutplasma (Zeitdifferenz höchstens etwa 10 Minuten) zusammengestellt.

Tabelle II.

Zuckergehalt des Blutplasmas (Ohrvene Kaninchen)	Zuckergehalt des gleichzeitig abgenommenen Kammerwassers	Differenz	Mittlere Differenz
0,20	0,19	+0,01	$\frac{0{,}86}{19} = 0{,}045\%$
0,28	0,19	+0,09	
0,20	0,15	+0,05	
0,20	0,19	+0,01	
0,28	0,16	+0,12	
0,27	0,21	+0,06	
0,24	0,22	+0,02	
0,22	0,19	+0,03	
0,25	0,17	+0,08	
0,20	0,19	+0,01	
0,22	0,19	+0,03	
0,21	0,19	+0,02	
0,26	0,24	+0,02	
0,32	0,25	+0,07	
0,22	0,18	+0,04	
0,19	0,08	+0,11	
0,12	0,05	+0,07	
0,26	0,28	−0,02	
0,19	0,15	+0,04	

Es war von vornherein zu erwarten, daß man hier nicht denselben Unterschied im Zuckergehalt finden würde als zwischen einem Serum (Plasma) und dessen Ultrafiltrat in vitro. Erstens ist allem Anschein nach im Auge vielmehr von einem Dialysat als von einem Ultrafiltrat die Rede, ist ja wahrscheinlich in normalen Verhältnissen eine nennenswerte Flüssigkeitsströmung im Auge kaum vorhanden [Weiss[1]), Hamburger[2])]. Ein etwa vorhandener Unterschied im Zuckergehalt zwischen Blut und Kammerwasser muß also durch Diffusion ausgeglichen werden. Der primär sich ändernde Faktor ist hier der Blutzucker, der täglich und stündlich hin und her schwankt; wir haben also kein konstantes, sondern ein veränderliches Filtrans, und das Dialysat folgt durch ausgleichende Diffusion diesen Änderungen von ferne nach. Wo ziemlich große Schwankungen im Blutzuckergehalt sich in kurzer Zeit vollziehen können, läßt sich erwarten, daß das Kammerwasser solchem schnellen Wechsel oft nicht sofort folgen kann.

[1]) Nagels Handbuch der Physiologie des Menschen III, S. 458 usw.

[2]) Die Ernährung des Auges. Leipzig 1914.

Es wird also Augenblicke geben, wo nach schneller Steigerung des Blutzuckergehalts ein etwa vorhandener Durchschnittsunterschied mit dem Kammerwasser abnormal hoch ausfällt; bei schneller Verringerung jedoch zeitweise völlig verschwinden kann, ja selbst für kurze Zeit die umgekehrten Verhältnisse sich finden können. Wenn jedoch ein konstanter Faktor vorhanden ist, der dahin wirkt, daß der Zuckergehalt des Plasmas ein höherer sei als der des Kammerwassers, so wird ein solches sofort aus den Mittelwerten einer großen Zahl gesonderter Bestimmungen sich zeigen müssen.

Aus der Tabelle II ersicht man, daß wirklich der mittlere Wert des Kammerzuckers deutlich (um einen Betrag von etwa 0,045%) hinter dem des Blutplasmas aus der Ohrvene zurückbleibt. Wie auf S. 192 hervorgehoben wurde, könnte solches sowohl von einem Mangel an Diffusionsfähigkeit eines Teiles des Zuckers (also vom gebundenen Zucker) als von einem Zuckerverbrauch im Kammerwasser herrühren; dieser Verbrauch wird jedoch aller Wahrscheinlichkeit nach bei der geringen Vitalität der Gewebe um die Augenkammer herum nur unbedeutend sein.

Bei den zahlreichen Bestimmungen wurde nur einmal ein (sehr wenig) höherer Gehalt im Kammerwasser gefunden; sämtliche andere Zahlen sind niedriger als im Blutplasma. Wir können also sagen, daß dieser Befund die Auffassung, daß ein Teil des Blutzuckers gebunden ist, verstärkt, und umgekehrt für die Auffassung des Kammerwassers als eines Dialysates des Blutes spricht.

Dieser Auffassung, daß der gebundene Teil des Blutzuckers dem Kammerwasser fernbleibt, wird noch mehr Stütze gegeben, wenn man mit dem Blutplasma auch das schnell sich regenerierende sekundäre Kammerwasser vergleicht. Wie bekannt, steht diese letzte Flüssigkeit, wenigstens beim Kaninchen, in einem viel direkterem Kontakt mit dem Blutplasma; sie zeigt schnelle Gerinnung, der Eiweißgehalt ist hoch. Wessely[1]) gibt dafür Werte von 1—2%; wir fanden ebenso wie Hagen[2]) auf Grund unserer refraktometrischen Bestimmungen viel höhere Beträge von etwa

---

[1]) Ergebn. d. Physiol. **4** (I), 565. 1905.

[2]) Klin. Monatsbl. f. Augenheilk. **64**, 187. 1920. Über das abweichende Verhalten des Menschenauges siehe auch Seidel, Graefes Arch. f. Ophthalm. **104**, 162. 1921.

3—5%; bei der dritten Punktion ist der Eiweißgehalt wiederum im allgemeinen höher als bei der zweiten, wahrscheinlich dadurch, daß nach der ersten Punktion die sich regenerierende Flüssigkeit für einen nicht unwichtigen Teil durch Zuströmung aus der eiweißfreien Glaskörperflüssigkeit gebildet wird, während nach der zweiten Punktion dies weniger der Fall sein wird. Offenbar wird bei der plötzlich sich einstellenden großen Druckdifferenz das Blutplasma durch die gelockerten Membrane hindurchgeschickt, während nur die Formelemente zurückbleiben.

Es zeigt sich nun (Tabelle III), daß auch hinsichtlich seines Zuckergehaltes dieses sekundäre Kammerwasser in schöner Weise dem Blutplasmazuckergehalte sich nähert; *daß also mit den*

Tabelle III.

Nummer des Kaninchens	I. Blutplasma am Anfang des Versuches		Zeit zwischen I. und II.	II. Primäres Kammerwasser		Zeit zwischen II. und III.	III. Sekundäres Kammerwasser		Zeit zwischen III. und IV.	IV. Blutplasma am Ende des Versuches	
	Zuckergehalt	Refraktion	Minuten	Zuckergehalt	Refraktion	Minuten	Zuckergehalt	Refraktion	Minuten	Zuckergehalt	Refraktion
1	0,20	—	—	0,19	1,3345	10	0,24	1,3436	—	—	—
2	0,20	—	10	0,15	1,3333	10	0,20	1,3424	5	0,21	1,3458
3	—	—	—	0,19	1,3339	15	0,20	1,3409	15	0,20	1,3461
4	0,28	1,3449	15	0,16	1,3341	10	0,19	1,3412	10	0,21	—
5	0,27	1,3477	10	0,21	1,3350	10	0,25	1,3444	20	0,29	1,3472
6	—	—	—	0,19	1,3341	10	0,21	1,3412	10	0,22	1,3468
7	0,24	1,3479	7	0,22	1,3340	10	0,27	1,3433	8	0,30	1,3472
8	0,19	1,3465	15	0,08	1,3380	12	0,15	1,3445	—	—	—
9	0,12	1,3435	25	0,05	1,3339	10	0,15	1,3395	—	—	—

Blutkolloiden auch der gebundene Zucker in der regenerierten Flüssigkeit vorhanden ist.

Die in Tabelle III gegebenen Zahlen betrachtend, soll man nicht vergessen, daß durch nervöse Reize (physiologische Sympathicusreize nach *Bang*) während eines Versuches der Blutzuckergehalt beim Kaninchen nicht unerheblich zunimmt. Da zwischen Spalte I und III meistens ein Zeitraum von 20—30 Min. liegt, kann es nicht wundern, daß der Zuckergehalt im sekundären Kammerwasser (Spalte III), wie auch die Tabelle deutlich ausweist, oft nicht mehr dem des ursprünglichen Blutplasmas (Spalte I) gleichzustellen ist, sondern dem des nachher entnommenen Blutplasmas (Spalte IV).

Wenn wir nun fragen, wie der gefundene mittlere Unterschied von etwa 0,045% sich zu dem Werte verhält, um welchen der

Zuckergehalt des Kaninchenserums höher ist als der des Ultrafiltrates desselben, so sehen wir aus einigen in Tabelle IV gegebenen Bestimmungen, daß der gebundene Zucker ziemlich großen Schwankungen unterliegt, im Mittel jedoch etwa 0,075% beträgt; wegen der nur wenig zahlreichen Bestimmungen und der großen Abweichungen vom Mittelwert kann man letzteren jedoch nicht als genau betrachten. Nach Analogie mit den Werten beim Ultrafiltrieren von Rinderserum erhalten, wird dieser Wert jedoch nicht zuviel von der Wirklichkeit abweichen und es scheint also, als ob die auf Grund des Dialysates in vivo (Kammerwasser) gefundene Zahl von 0,045 nicht unerheblich hinter dem beim Ultrafiltrieren sich zeigendem Werte von 0,075 zurückbleibt. Eine nähere Betrachtung lehrt jedoch, daß dieser Unterschied nur scheinbar ist. Unsere mitgeteilten Plasmawerte stammen ja von einem venösen Blute aus der Ohrvene, und bekannterweise ist im allgemeinen der Blutzuckergehalt der Körpervenen niedriger

Tabelle IV.

Zuckergehalt des Kaninchenserums (aus Plasma erhalten)	Zuckergehalt des Ultrafiltrates dieses Kaninchenserums	Differenz	Mittlere Differenz
0,36	0,28	0,08	$\frac{0,52}{7} = 0,075\%$
0,47	0,41	0,06	
0,27	0,15	0,12	
0,30	0,18	0,12	
0,22	0,19	0,03	
0,24	0,22	0,02	
0,25	0,16	0,09	

als der arterielle wegen des (variierenden) Zuckerverbrauches in den verschiedenen Organen. Ein einfacher Versuch lehrte uns, daß dies wirklich zutrifft, wie aus Tabelle V erhellt, wo in zur selben Zeit entnommenen Blutvolumina aus A. carotis und der Vena jugularis posterior des Kaninchens (mittels angebundener Kanüle entleert) der Blutzuckergehalt bestimmt wurde.

Nebenbei zeigte sich dabei, daß sowohl im rein venösen als im arteriellen Blut die Blutkörperchen zuckerfrei sind, und durch gleichzeitige Untersuchung des Ultrafiltrates, daß der verminderte Zuckergehalt des venösen Plasmas nur den freien Zucker betrifft; die Werte für den gebundenen Zucker sind eher erhöht. Daraus kann also geschlossen werden, daß der freie Teil des Zuckers fortwährend verbraucht wird.

Tabelle V.

Vergleichende Zuckerwerte für arterielles und venöses Blut.

Nummer des Kaninchens	Es wurden untersucht in beiden Blutarten	Blut aus V. facialis post. (etwa 12 ccm) %	Blut aus A. carotis (etwa 12 ccm) %
1	Blutkörperchenvolumen	32	29
	Blutzucker des totalen Blutes	0,24	0,31
	Plasmazucker daraus berechnet	0,36	0,45
	Plasmazucker bestimmt	0,36	0,45
	Zuckergehalt des Serums aus Plasma erhalten	0,36	0,47
	Zuckergehalt des Ultrafiltrates dieses Serums	0,28	0,41
	Menge des gebundenen Zuckers	0,08	0,06
	Refraktion des Serums	1,3449	1,3439
2	Zuckergehalt des Serums aus Plasma erhalten	0,27	0,30
	Zuckergehalt des Ultrafiltrates dieses Serums	0,15	0,18
	Menge des gebundenen Zuckers	0,12	0,12
3	Zuckergehalt des Serums aus Plasma erhalten	0,22	0,24
	Zuckergehalt des Ultrafiltrates dieses Serums	0,19	0,22
	Menge des gebundenen Zuckers	0,03	0,02

Zwischen venösem und arteriellem Blute finden wir nun einen mittleren Unterschied von $\frac{0,11 + 0,03 + 0,02}{3} = 0,05\%$, ein Wert, welcher, wenn auch nicht genau, keineswegs zu vernachlässigen ist. Wo nun das arterielle (capillare) Blut sozusagen den Stoß zum Auswechsel mit den Geweben gibt, und das venöse Blut nur das Resultat dieser Wechselwirkung ist, sollte man für den Vergleich mit dem Kammerwasser auch besser das arterielle Blut nehmen; dieses ist an einem bestimmten Augenblick für den ganzen Körper konstant, das venöse Blut variiert auch in seinem Zuckergehalt nach den verschiedenen Organen, aus denen es herstammt; das Blut aus einer Ohrvene hat zur selben Zeit wahrscheinlich einen anderen Zuckergehalt als das venöse Nierenblut, und könnte man das rein venöse Blut entnehmen, das nur von den Geweben um die vordere Augenkammer herrührt, so würde dessen Zuckergehalt der genaue Spiegel des (wahrscheinlich geringen) Zuckerverbrauches dieser Gewebe sein. Wir müssen also dem gefundenen Unterschied von 0,045% zwischen Blutplasma- und Kammerwasserzucker den Betrag zufügen (sagen wir

0,05%), um welchen der Zuckergehalt des venösen Blutes des Ohres geringer ist als der des arteriellen, und bekommen dann den Wert, um welchen der Kammerzuckergehalt hinter dem des arteriellen Blutes, mit welchem es in Wechselwirkung steht, zurückbleibt. Wir finden also bei der Ultrafiltration in vitro und beim Dialysat in vivo gut übereinstimmende Beträge für den gebundenen Zucker.

Wie steht es nun mit der Diffusionsschnelligkeit des Plasmazuckers in das Kammerwasser hinein, wenn durch Adrenalininjektion eine starke Hyperglykämie hervorgerufen wird? Ein Ultrafiltrationsversuch, in Tabelle VI zusammengefaßt, lehrt, daß die Steigerung des Zuckergehaltes bei dieser Hyperglykämie nur den freien Zucker betrifft; die Menge des gebundenen Zuckers ändert sich nicht nennenswert. In demselben Versuch wurde auch die Zuckerzunahme im Vivodialysat (Kammerwasser) nach dieser Adrenalininjektion bestimmt, und man sieht, daß etwa 2 Stunden nach der ersten Injektion, also im Augenblick, wo erfahrungsgemäß schon während längerer Zeit die maximale Hyperglykämie besteht, der Zuckergehalt des Kammerwassers zwar stark zugenommen hat, aber noch bedeutend hinter dem eines Blutultrafiltrates zurückbleibt.

Tabelle VI.

Steigerung des Zuckergehaltes etwa 2 Stunden nach Adrenalininjektion im Blutplasma, dessen Ultrafiltrate und im Kammerwasser.

Untersuchte Flüssigkeit	Zuckergehalt vor der Adrenalininjektion	Zuckergehalt etwa 2 Stunden nach der Adrenalininjektion
Blutserum	0,25	0,61
Ultrafiltrat dieses Blutserums .	0,16	0,54
Primäres Kammerwasser . . .	0,24	0,44

Aus Tabelle VII, wo aus einer größeren Versuchsreihe die Werte für Kammerwasser und Plasma vor und etwa 2 Stunden nach der Adrenalininjektion zusammengestellt sind, sehen wir im allgemeinen dasselbe; es sei bemerkt, daß überall, wo in Spalte I die Werte des Plasmazuckers nach der Adrenalininjektion nicht angegeben sind, man statt deren ebensogut den Zuckergehalt des wohlbestimmten sekundären Kammerwassers nehmen kann. Wir sehen, daß zwar der Zuckergehalt im Kammerwasser im

allgemeinen schnell zunimmt, aber dennoch mehr hinter dem des Plasmas zurückbleibt, als auf Grund der Menge des gebundenen Zuckers erwartet werden konnte.

Tabelle VII.
Steigerung des Zuckergehaltes im Blutplasma und im Kammerwasser etwa 2 Stunden nach Adrenalininjektion.

Nummer des Kaninchens	I. Zuckergehalt des Blutplasmas		II. Zuckergehalt des primären Kammerwassers		III. Zuckergehalt des sekundären Kammerwassers	
	vor der Adrenalininjektion	etwa 2 Std. nach der Adrenalininjekt.	vor der Adrenalininjektion	etwa 2 Std. nach der Adrenalininjekt.	vor der Adrenalininjektion	etwa 2 Std. nach der Adrenalininjekt.
1	0,21	0,62	0,19	0,40	—	0,63
2	0,26	0,66	0,24	0,44	—	—
3	0,19	—	0,08	0,22	0,15	0,25
4	0,19	—	0,15	0,25	0,20	0,36
5	0,12	—	0,05	0,20	0,15	0,39
6	0,26	—	0,28	0,49	0,26	0,52

Zwar gibt es auch Fälle (Nr. 3 und 6), wo die Übereinstimmung eine viel bessere ist. Daß die Resultate nicht immer genau übereinstimmen, wird verständlich, wenn man bedenkt, daß die Verhältnisse nach Adrenalininjektion etwas kompliziert sind; es bildet sich nicht nur eine Hyperglykämie, sondern zugleich tritt auch eine maximale Gefäßverengerung auf während einer nicht immer gleich langen Zeit; meistens dauert diese aber wahrscheinlich weniger lang als die Hyperglykämie, was aus dem eigentümlichen Verhalten des Eiweißgehaltes im sekundären Kammerwasser ersichtlich ist. Wessely[1]) wies schon nach, daß letzteres sich nach Adrenalininjektion durch sehr geringen Eiweißgehalt auszeichnet, und solches infolge der Gefäßverengerung. Nun sehen wir aus dem ausführlichen Protokolle in Tabelle VIII vom Verlauf einiger Adrenalininjektionen, daß der Eiweißgehalt im sekundären Kammerwasser etwa eine halbe Stunde nach der Adrenalininjektion noch minimal ist (Kaninchen 1), jedoch an späteren Zeitpunkten, oft schon kurze Zeit nachher (Kaninchen 2 usw.) schon wieder hoch ausfällt. In Einklang damit können wir erwarten, daß während der (wechselnd langen) Dauer der maximalen Gefäßverengung auch die Diffusionsschnelligkeit eine sehr geringe sein wird; die noch sehr geringe Zunahme des Kammerwasserzuckers im Fall 1, Tabelle VIII, wo schon längst der Plasmazuckerwert sehr hoch ist, weist darauf auch hin.

[1]) l. c.

Tabelle VIII. Verlauf der Steigerung des Zuckergehaltes im Blutplasma und primärem und sekundärem Kammerwasser nach Adrenalininjektion.

Zeitpunkt der Untersuchung, vor oder nach der Adrenalininjektion

Z. G. = Zuckergehalt, R. = Refraktion, A. I. = Adrenalininjektion

Nr. des untersuchten Kaninchens	Untersuchte Flüssigkeit	A. I.	10′ nach A. I.		25′ nach A. I.		35′ nach A. I.	
			Z. G.	R.	Z. G.	R.	Z. G.	R.
1	Blutplasma		0,43	1,3459	—	—	—	—
	Primäres Kammerwasser des rechten Auges	—	—	—	0,22	1,3341	—	—
	Sekundär. Kammerwasser des rechten Auges	—	—	—	—	—	0,29	1,3352

Nr.	Untersuchte Flüssigkeit	30′ vor A. I.		5′ vor A. I.		A.I.	30′ nach A. I.		40′ nach A. I.		48′ nach A. I.		60′ nach A. I.	
		Z. G.	R.	Z. G.	R.		Z. G.	R.	Z. G.	R.	Z. G.	R.	Z. G.	R.
2	Blutplasma	—	—	0,25	1,3457		0,38	1,3452	—	—	—	—	—	—
	Primäres Kammerwasser des rechten Auges	0,17	1,3339	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—
	Primäres Kammerwasser des linken Auges	—	—	—	—		—	—	0,24	1,3345	—	—	—	—
	Sekundär. Kammerwasser des rechten Auges	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,24	1,3402	—	—
	Sekundär. Kammerwasser des linken Auges	—	—	=	—	—	—	—	—	—	—	—	keine Flüssigkeit erhalten	

Nr.	Untersuchte Flüssigkeit	25′ vor A. I.		10′ vor A. I.			1h 10′ nach A.I.		2h 50′ nach A.I.		3h 10′ nach A.I.		3h 15′ nach A.I.		3h 20′ nach A.I.	
		Z. G.	R.	Z. G.	R.	Adrenalininjektion	Z. G.	R.	Z. G.	R.	Z. G.	R.	Z. G.	R.	Z. G.	R.
3	Blutplasma	0,22	1,3484	—	—		0,60	1,3463	>0,5	1,3471	—	—	—	—	—	—
	Primäres Kammerwasser des rechten Auges	—	—	0,19	1,3341		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Primäres Kammerwasser des linken Auges	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—	mißlungen		—	—
	Sekundär. Kammerwasser des rechten Auges	—	—	—	—		—	—	—	—	0,49	1,3400	—	—	—	—
	Sekundär. Kammerwasser des linken Auges	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—	0,54	1,3485

4	30' vor A. I.		10' vor A. I.		Adrenalininjektion	1h 20' nach A.I.		2h 5' nach A. I.		2h 20' nach A.I.		2h 30' nach A.I.		2h 36' nach A.I.	
	Z. G.	R.	Z. G.	R.		Z. G.	R.	Z. G.	R.	Z. G.	R.	Z. G.	R.	Z. G.	R.
Blutplasma	0,21	1,3474	—	—		0,56	1,3469	>0,6	1,3469	—	—	—	—	—	—
Primäres Kammerwasser des rechten Auges	—	—	0,19	1,3349		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Primäres Kammerwasser des linken Auges	—	—	—	—		—	—	—	—	0,40	1,3352	—	—	—	—
Sekundär. Kammerwasser des rechten Auges	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—	0,50	1,3421	—	—
Sekundär. Kammerwasser des linken Auges	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—	0,63	1,3443

5	20' vor A.I.		10' vor A.I.		Adrenalininjektion	2h 10' nach A.I.		2h 30' nach A.I.	
	Z. G.	R.	Z. G.	R.		Z. G.	R.	Z. G.	R.
Blutplasma	0,26	1,3420	—	—		0,66	1,3450	—	—
Primäres Kammerwasser des rechten Auges	—	—	0,24	1,3345		—	—	—	—
Primäres Kammerwasser des linken Auges	—	—	—	—		—	—	0,44	1,3348

6	15' vor A.I.		5' vor A.I.		Adrenalininjektion	1h 20' nach A.I.		2h nach A. I.		3h 40' nach A.I.		3h 55' nach A.I.		6h 20' nach A.I		6h 30' nach A.I.	
	Z. G.	R.	Z. G.	R.		Z. G.	R.	Z. G.	R.	Z. G.	R.	Z. G.	R.	Z. G.	R.	Z. G.	R.
Blutplasma	0,32	1,3459	—	—		0,54	1,3459	0,70	1,3462	0,44	1,3467	—	—	0,21	1,3451	—	—
Primäres Kammerwasser des rechten Auges	—	—	0,24	1,3342		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Primäres Kammerwasser des linken Auges	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—	0,41	1,3360	—	—	—	—
Sekundär. Kammerwasser des rechten Auges	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,21	1,3410
Sekundär. Kammerwasser des linken Auges	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

7	10' vor A. I.		Adrenalininjektion	1h 20' nach A.I.		2h 20' nach A.I.		2h 35' nach A.I.		4h 40' nach A.I.		4h 50' nach A.I.	
	Z. G.	R.		Z.G.	R.	Z. G.	R.	Z. G.	R.	Z.G.	R.	Z. G.	R.
Blutplasma	0,30	1,3459		0,52	—	0,61	1,3460	—	—	0,27	1,3450	—	—
Primäres Kammerwasser des rechten Auges	—	—		—	—	—	—	0,27	1,3349	—	—	—	—
Primäres Kammerwasser des linken Auges	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—	0,32	1,3370

Durch eine wechselnd schnelle Diffusionsgeschwindigkeit, die infolge der verschiedenen Dauer der Gefäßverengerung anzunehmen ist, lassen sich unsere Resultate miteinander gut in Einklang bringen: es wird nicht immer, ja nur selten, gelingen, den Zeitpunkt bei der maximalen Hyperglykämie zu treffen, wo der Zuckergehalt des Kammerwassers dem des Ultrafiltrates gleichgekommen ist.

Aus dem Protokoll in Tabelle VIII sieht man, daß die maximale Hyperglykämie nach 2—3 Stunden wieder abzuklingen anfängt; auch diese Abnahme wird etwas verspätet (Fall 6 und 7) vom Kammerwasser befolgt, und im Fall 7 konnte der Moment getroffen werden, wo infolgedessen für kurze Zeit der Plasmazuckergehalt schon niedriger war als im Kammerwasser.

Fall 3 und noch schöner Fall 4 illustrieren in frappanter Weise den Einfluß der Diffusionsschnelligkeit. Im rechten Auge hatte sich schon gerade vor der Adrenalininjektion ein sekundäres Kammerwasser mit hohem Eiweißgehalt gebildet. Infolge der Adrenalingabe diffundierte in dasselbe nun langsam der Zucker aus dem hyperglykämischen Plasma hinein. Als 2 Stunden nach der Adrenalininjektion (Fall 4) punktiert wurde, war im sekundären Kammerwasser des rechten Auges der Zuckergehalt deutlich höher als im primären Kammerwasser des linken Auges (0,5 und 0,4%), offenbar infolge des im rechten Auge vorhandenen gebundenen Zuckers; dennoch blieb er deutlich hinter dem des Plasmas (> 0,6) an diesem Augenblick zurück; daß dies wirklich auf langsamer Diffusion beruhen muß, sieht man aus dem Werte für das sekundäre Kammerwasser des linken Auges, welches, in einigen Minuten hineingeströmt und in seinem Zuckergehalt mit dem des gleichzeitigen Plasmas völlig übereinstimmt (0,63%).

Zusammenfassend können wir also sagen, daß **der mittlere Zuckergehalt des normalen Kammerwassers um einen ziemlich großen Betrag niedriger ist als der des Blutplasmas; daß aus Adrenalinversuchen ersichtlich ist, daß eine Zunahme des Plasmazuckers schnell in das Kammerwasser hineindiffundiert, aber in der ersten Zeit infolge der durch Adrenalin hervorgerufenen Gefäßverengerung wahrscheinlich langsamer als unter normalen Verhältnissen. Der Zuckergehalt im sekundären Kammerwasser ist ziemlich genau derselbe als im Plasma zu gleicher Zeit.**

Wenn wir mit diesen Resultaten die Ergebnisse der schon erwähnten Arbeit von Ask vergleichen, so zeigen sich beim ersten Blicke bemerkenswerte Unterschiede. Ask vermeldet erstens, daß der Zuckergehalt des Kammerwassers dem des Blutplasmas gleichzustellen ist und höher ist als der des totalen Blutes. Wir sind überzeugt, daß dieser Befund seinen Grund hat in den zu niedrigen Plasmawerten Asks, wo der Zuckergehalt zweifelsohne schon verringert war (siehe S. 198). Nicht beistimmen können wir der zweiten Schlußfolgerung Asks, daß im sekundären Kammerwasser der Zuckergehalt dem des primären gleich ist; dafür sind unsere Zahlen in Tabelle III und auch in Tabelle VIII zu deutlich; der Vergleich mit Plasmawerten, an verschiedenen Zeitpunkten entnommen, macht es durchaus unmöglich, an eine während des Versuches eintretende Hyperglykämie zu denken. Es scheint uns von Bedeutung, dies zu betonen, da die Frage des gebundenen Zuckers hiermit in engster Weise zusammenhängt; wären primäres und sekundäres Kammerwasser von gleichem Zuckergehalt, so würde solches dem Bestehen eines gebundenen Zuckers eine Stütze nehmen.

Ebenso wie wir konnte auch Ask feststellen, daß der höhere Zuckergehalt im Kammerwasser nach Adrenalininjektion meistens deutlich hinter dem des Plasmas zurückbleibt. Ask läßt die Möglichkeit offen, daß wir es hier mit einer zweckmäßigen Wirkung zu tun haben, damit die höheren Plasmazuckerkonzentrationen von den Augenflüssigkeiten fernbleiben. Wir haben klargelegt, warum unseres Ersehens hier nur wechselnde Diffusionsverhältnisse in Betracht kommen werden.

Zuckergehalt der Cerebrospinalflüssigkeit.

Das Gehirnwasser ist gerade in der letzten Zeit vielfach untersucht, insbesondere von amerikanischer Seite. Cullen und Ellis[1]) zeigten die fast absolute Übereinstimmung zwischen dem Ureumgehalt des Blutes und der Cerebrospinalflüssigkeit und bestätigten dadurch den Befund früherer Autoren. Wasserstoffionenkonzentration und Bicarbonatgehalt sind fast dieselben als im Blute. Dagegen ist die Konzentration an Harnsäure eine viel geringere als im Blute [Fine und Myers[2]), Gradwohl und

[1]) Journ. of biol. chem. **20**, 511. 1915.
[2]) Proc. of the soc. f. exp. biol. a. med. **13**, 126. 1916.

Blaivas[1])]. Dieselben Autoren und ebenso Weston[2]) teilen auch für den Zuckergehalt des Gehirnwassers Werte mit, welche nur etwa $^1/_2$—$^2/_3$ von denen des Blutzuckers erreichen; wie andere Autoren erwähnen sie dabei, daß bei tuberkulöser Meningitis der Zucker in der Cerebrospinalflüssigkeit oft völlig fehlt; es betraf hier immer Versuche an Menschen mit verschiedenen Krankheiten. Wo hier mit Blutzucker allem Anscheine nach der Zucker des totalen Blutes gemeint wird, sollte aus diesen Zahlen folgen, daß im Vergleich mit dem Plasmazucker der Zuckergehalt des menschlichen Gehirnwassers sehr niedrig ist. Dies weist darauf hin, daß zumal hier die einfache Angabe, daß der Zuckergehalt des Gehirnwassers dem des Blutes entspricht [siehe u. m. Mc Leod[3])], gerechtem Zweifel unterliegt und näherer Untersuchung bedarf. Unsere eigenen Untersuchungen bestätigen für das Kaninchen den Befund der zuerst genannten Autoren, wie aus Tabelle IX ersichtlich ist.

Tabelle IX.

Zuckergehalt der normalen Cerebrospinalflüssigkeit im Vergleich mit dem des Blutplasmas.

Nummer d. untersuchten Kaninchens	I. Blutplasma am Anfang des Versuches		Zeit zwischen I. und II.	II. Cerebrospinalflüssigkeit		Zeit zwischen II. und III.	III. Blutplasma am Ende des Versuches		Differenz zwischen Plasma und Cerebrospinalflüssigkeit	Mittlere Differenz
	Zuckergehalt	Refraktion	Minuten	Zuckergehalt	Refraktion	Minuten	Zuckergehalt	Refraktion		
1	—	—	—	0,14	1,3341	15	0,40	1,3451	0,26	
2	—	—	—	0,18	1,3341	8	0,48	1,3441	0,30	
3	0,23	1,3464	50	0,20	1,3341	20	0,40	1,3456	0,20	$\frac{1,21}{7}$ = 0,17
4	0,30	—	35	0,20	1,3341	15	0,36	1,3451	0,16	
5	0,19	—	25	0,09	1,3353	—	—	—	0,10	
6	0,12	1,3435	15	0,02	1,3334	—	—	—	0,10	
7	0,26	1,3444	20	0,17	1,3338	—	0,26	—	0,09	

Die vergleichende Untersuchung mit dem Plasmazucker gestaltet sich hier etwas schwieriger als beim Kammerwasser; es dauert ja der Eingriff immer längere Zeit, als die Entnahme des Kammerwassers fordert; sehr oft finden wir deshalb am Ende des Versuches einen abnormal hohen Plasmazuckerwert, was um so mehr zu erwarten ist, als wir hier am Orte des Zuckerstiches arbeiteten. Da es möglich wäre, daß dieser Zucker nur sehr

[1]) Newer methods of Blood and Urine Chemistry, 1920, S. 313.

[2]) Journ. of med. research. 35, 199.

[3]) Physiology and Biology in modern Medicine 1920.

langsam ins Gehirnwasser hineindiffundierte, möchten also die im Fall 1—4 gefundenen Zuckerwerte zu hohe Unterschiede vortäuschen. Fall 5—7 zeigt jedoch, daß auch im Augenblick, wo niedrige Plasmawerte gefunden werden, der Zuckergehalt der Cerebrospinalflüssigkeit viel geringer ist. Möchte auch die mittlere Differenz ad 0,17% infolge der zu hohen Werte der ersten Fälle in Wirklichkeit zu hoch sein, so sieht man dennoch aus Tabelle X, daß auch dem Kammerwasser gegenüber der Zuckergehalt des Gehirnwassers deutlich zurückbleibt.

Tabelle X.

Vergleichende Zuckerwerte von Blutplasma, Kammerwasser und Cerebrospinalflüssigkeit.

Nummer des Kaninchens	Zuckergehalt des Plasmas	Zuckergehalt des Kammerwassers	Zuckergehalt der Cerebrospinalflüssigkeit
1	0,33	0,26	0,20
2	0,12	0,05	0,02
3	0,19	0,15	0,09
4	0,26	0,28	0,17

Für die Erklärung dieses niedrigen Prozentgehaltes würde eine sehr geringe Diffusionsgeschwindigkeit des Zuckers in das Gehirnwasser hinein verantwortlich gemacht werden können, welche einem (selbst eventuell minimalen) Verbrauch nicht gleichen Schritt halten möchte. Man könnte um so mehr daran denken, da andere dem Plasma zugefügte krystalloiden Stoffe, wie z. B. J-Salze, in die Cerebrospinalflüssigkeit im Gegensatz zum Kammerwasser gar nicht oder überaus langsam diffundieren[1]).

Versuche mit Adrenalinhyperglykämie jedoch, in derselben Weise eingerichtet wie beim Kammerwasser, und auch jetzt gleichzeitig mit dem Kammerwasser vorgenommen, lassen keinen Zweifel übrig, daß die Diffusion des Zuckers hier ebensowenig wie beim Auge zu wünschen übrig läßt. Aus Tabelle XI ist dies ohne weiteres deutlich. Wo nach der Adrenalingabe keine Plasmabestimmung gemacht wurde, kann statt dessen wiederum der Zuckergehalt des sekundären Kammerwassers zum Vergleich gewählt werden.

Wir können also sagen, daß der mittlere Zuckergehalt der Cerebrospinalflüssigkeit beträchtlich hinter den

[1]) Über die betreffenden Versuche wird in der zweiten Mitteilung berichtet werden.

Tabelle XI.

Einfluß von Adrenalininjektion auf den Zuckergehalt von Blutplasma, Kammerwasser und Cerebrospinalflüssigkeit.

Nummer des Kaninchens	Untersuchte Flüssigkeit	Zuckergehalt normal beim Anfang des Versuches	Zuckergehalt etwa 2 Stdn. nach Injektion von ca. 0,75 ccm 1 promill. Adrenalin
1	Blutplasma	0,19	—
	Sekundäres Kammerwasser	0,15	0,25
	Primäres Kammerwasser	0,08	0,22
	Cerebrospinalflüssigkeit	—	0,18
2	Blutplasma	0,19	—
	Sekundäres Kammerwasser	0,20	0,36
	Primäres Kammerwasser	0,15	0,25
	Cerebrospinalflüssigkeit	0,09	0,22
3	Blutplasma	0,12	—
	Sekundäres Kammerwasser	0,15	0,39
	Primäres Kammerwasser	0,05	0,20
	Cerebrospinalflüssigkeit	0,02	0,17
4	Blutplasma	0,26	—
	Sekundäres Kammerwasser	0,26	0,52
	Primäres Kammerwasser	0,28	0,49
	Cerebrospinalflüssigkeit	0,17	0,33

Werten des Plasmas und des Kammerwassers zurückbleibt. Kammerwasser und Gehirnwasser sind beide nahezu eiweißfrei; in Salzgehalt, in fast allen Eigenschaften findet man zwischen beiden die größte Übereinstimmung. Für das abweichende Betragen der Cerebrospinalflüssigkeit dem Zucker gegenüber kann nicht eine geringere Diffusionsgeschwindigkeit des Zuckers in die Flüssigkeit hinein verantwortlich gemacht werden. Wenn wir annehmen, daß auf Grund des gebundenen Teiles des Plasmazuckers die Cerebrospinalflüssigkeit mit dem Kammerwasser übereinstimmen sollte, so muß der gefundene Unterschied zwischen Kammerwasser und Gehirnwasser anderswo herrühren.

Unseres Erachtens kann die Erklärung keine andere sein als diese, daß aus dem Gehirnwasser im Gegensatz zum Kammerwasser der Zuckerverbrauch ein erheblicher sein muß; es muß dies der Ausdruck der Organarbeit des Gehirns sein. Die Cerebrospinalflüssigkeit ist ja gewissermaßen nichts anderes als die Gewebsflüssigkeit des Gehirnes (man denke an die perivasculären Lymphräume), deren chemische Zusammensetzung im allgemeinen und deren Zuckergehalt im besonderen nur entweder von der Seite der einen Membran

(Trennungsmembran mit dem Blute) oder von der anderen Seite (Gehirngewebe) beeinflußt werden kann. Ein Unterschied mit dem Blute, der größer als die Menge des gebundenen Zuckers ist, kann also nur vom Gehirngewebe herrühren; der Verbrauch des Zuckers von dieser Seite muß so schnell vonstatten gehen, daß der fortwährende Ersatz durch Diffusion von seiten des Blutes damit nur im Gleichgewicht ist auf Kosten eines Abfalles in der Zuckerkonzentration. Der Zuckerspiegel in den Gewebeflüssigkeiten der verschiedenen Organe muß ja unter sonst gleichen Umständen im umgekehrten Verhältnis stehen zur Intensität des Zuckerstoffwechsels in den betreffenden Organen, geradeso wie es auch mit der Sauerstoffspannung der Fall ist. Zwar gibt es über die Intensität des Stoffwechsels im Gehirne keine feststehenden Daten, aber es wird im allgemeinen angenommen, daß derselbe relativ hoch ist; jedenfalls aller Wahrscheinlichkeit nach höher als in den Geweben um das Kammerwasser herum.

Es wäre verfrüht, hier über die Bedeutung des gebundenen Zuckers bei diesem Zuckerstoffwechsel viel zu sagen, solange nicht die Natur des zuckerbindenden Kolloids (Adsorbens?) genauer bekannt ist. Aus den Versuchen über das Verhalten des freien und des gebundenen Zuckers im arteriellen und im venösen Blute scheint hervorzugehen, daß die freie und nicht die gebundene Fraktion in den Geweben verbraucht wird, oder besser gesagt, zum fortwährenden Ersatz des fortwährend verbrauchten Zuckers dient; es ist dies auch auf Grund der schnelleren Diffusion des freien Zuckers von vornherein wahrscheinlich. Auf der anderen Seite weist das Bestehen einer gebundenen Form des Zuckers an und für sich daraufhin, daß auch in den Zellen selbst die gebundene Form eine Rolle spielen muß, da ja die Kolloide des Blutplasmas cellulären Ursprungs sind und meistenteils direkte Zellbestandteile sein werden. Es wäre sehr gut möglich, daß im Gerüste der Zellstruktur eine Bindung an gewisse Zellbestandteile den weiteren Umsatz (Spaltung oder Polymerisation) einleite nach Art einer Fermentwirkung. Jedenfalls muß ein genaues Studium dieses gebundenen Zuckers auch hinsichtlich der Diabetesfrage von großer Wichtigkeit sein.

Zusammenfassung.

Wir können die Resultate dieser Arbeit folgenderweise zusammenfassen:

1. Bei Kaninchen bleibt der Gehalt an Glucose in Gewebeflüssigkeiten, welche nahezu keine Kolloide enthalten (Humor aquaeus, Cerebrospinalflüssigkeit), als Regel mehr oder weniger hinter dem des Blutplasmas zurück. Diese Erscheinung ist im Einklang mit der Auffassung, nach welcher diese Flüssigkeiten sich wie ein Ultrafiltrat (Dialysat) aus dem Blute verhalten, wobei ebenso wie beim Ultrafiltrat in vitro der gebundene Teil des Zuckers im Blute zurückbleibt.

2. Versuche mit künstlicher Hyperglykämie mittels Adrenalin zeigten, daß die Diffusionsgeschwindigkeit des Plasmazuckers in die untersuchten Flüssigkeiten hinein eine ziemlich rasche ist, und für die Cerebrospinalflüssigkeit und das Kammerwasser von derselben Größenordnung.

3. Beim Kammerwasser ist der Unterschied im Zuckergehalt dem Blutzucker gegenüber von derselben Größe wie beim Ultrafiltrat in vitro gegenüber dem Serum. Das sekundäre Kammerwasser, das sich schnell nach der Punktion regeneriert, enthält den größten Teil der Plasmakolloide, und zugleich damit auch den gebundenen Zucker; sein Zuckergehalt entspricht völlig dem des Plasmas im nämlichen Augenblick.

4. Der Zuckergehalt der Cerebrospinalflüssigkeit ist erheblich niedriger als der des Blutplasmas und des Kammerwassers. Dieser Unterschied mit dem Kammerwasser kann, wo die Diffusionsgeschwindigkeit des Zuckers dieselbe ist, nur durch einen größeren Zuckerverbrauch im Gehirne den vorderen Augengeweben gegenüber erklärt werden.

3. Der Zuckergehalt des Blutes der Vena facialis posterior ist niedriger als der des zur selben Zeit entnommenen arteriellen Carotisblutes. Dieser Unterschied kommt ganz auf Rechnung des freien Zuckers, und daraus kann geschlossen werden, daß letzterer in den Geweben verbraucht wird.

Auch die durch Adrenalininjektion hervorgerufene Zunahme des Zuckergehaltes im Plasma ist ganz auf Rechnung des frei vorhandenen Zuckers zu stellen.

Über das Flockungsvermögen des menschlichen Blutplasmas.

Von

Wilhelm Starlinger.

(Aus der II. Medizinischen Universitätsklinik in Wien.)

(Eingegangen am 20. Juli 1921.)

Nachdem die Auffassung vom Wesen jener Vorgänge und Phänomene, die wir im Rahmen der Serologie zusammenfassen, durch die grundlegenden chemisch-physikalischen Arbeiten von Landsteiner[1]), Hirschfeld und Klinger[2]) und namentlich von Sachs und seinen Schülern[3]) in so vielfacher Weise auf kolloidchemische Grundlagen gestellt wurde, muß es eigentlich Wunder nehmen, daß bei der experimentellen Forschung zur Klärung dieser auch heute noch dunklen Fragen nicht auch das Blutplasma herangezogen wurde. Denn es ist doch ohne weiteres verständlich, daß Verschiebungen im Rahmen der Eiweißkörper des Blutes bei Anwesenheit der labilsten Fraktion derselben, des Fibrinogens, einerseits in ihrem Verlaufe nach anderer Richtung gelenkt werden können, andererseits aber auch in Anbetracht der exquisiten Labilität dieses Bluteiweißkörpers bei seiner Verwendung als Indicator besonders deutlich in Erscheinung treten müssen.

Erst in jüngster Zeit haben Sachs und v. Oettingen[4]), von ähnlichen Überlegungen ausgehend, das Plasma von schwangeren und normalen Frauen und von Nabelschnurblut in den Bereich

[1]) Landsteiner, zusammenfassend, Wien. klin. Wochenschr. 47. 1909.

[2]) Hirschfeld und Klinger, zusammenfassend, Berl. klin. Wochenschr. 25. 1914.

[3]) Sachs, zusammenfassend, Kolloid-Zeitschr. 1919, S. 24, und Therap. Halbmonatsh. 14. 1920.

[4]) Sachs und v. Oettingen, Münch. med. Wochenschr. 1921, S. 12.

ihrer Untersuchungen gezogen und dabei Ergebnisse verzeichnet, die zu weiterer Arbeit auf diesem Gebiete anregen müssen.

Im folgenden soll nun über Versuche berichtet werden, die ihren Ausgang vom Studium des Agglutinations- und Senkungsphänomens der Erythrocyten genommen hatten, wo der Einfluß des Blutplasmas besonders deutlich zum Ausdruck kommt, und die geeignet erscheinen, einen Versuch zur Deutung des Wesens der Fibrinogenflockung im Plasma zu rechtfertigen.

Bei Ausflockung des Plasmas von schwangeren und normalen Frauen und von Nabelschnurblut durch die gebräuchlichen Methoden der Fibrinogenfällung konnten Sachs und v. Oettingen ein durchaus differentes Verhalten in dem Sinne beobachten, daß beim Schwangerenplasma meist eine dichte und grobe Flockung auftrat, die beim Plasma der normalen Frau bereits einer Trübung Platz machte und im Nabelschnurplasma überhaupt völlig fehlte. Analog verhielt sich dazu die Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten im Vollblut und die Oberflächenspannung des Plasmas, indem die Senkungsgeschwindigkeit vom Schwangerenblut über das Normalblut zum Nabelschnurblut sich verlangsamte und die Oberflächenspannung in gleicher Richtung zunahm. Als Ursache dieser Phänomene wurde lediglich ein labiler bzw. stabiler physikalisch-chemischer Zustand des Fibrinogens angenommen und der Einfluß seiner Quantität als wenig bedeutungsvoll von der Hand gewiesen.

So sehr nun für das Auftreten einer Fibrinogenflockung im Plasma eine künstliche physikalisch-chemische Zustandsänderung maßgebend werden kann, wie im folgenden noch eingehend zu zeigen sein wird, so ist doch als von ausschlaggebendster Bedeutung die Menge des in Reaktion tretenden Fibrinogens anzusehen, namentlich was das unbeeinflußte Citratplasma anlangt, dessen Verhalten uns die Verhältnisse des einer direkten Prüfung nicht zugänglichen nativen Plasmas im großen und ganzen wohl annähernd widerspiegelt. Darauf weist ja schon die Tatsache hin, daß das Schwangerenplasma sehr viel Fibrinogen enthält, während das Nabelschnurplasma eines solchen überhaupt fast gänzlich entbehrt. Weiter ist die Senkung der roten Blutkörperchen unmittelbar abhängig von der Menge des Fibrinogens[1]), und wenn also Sachs und v. Oettingen einen Parallelismus zwischen Senkung und Flockung festgestellt haben, welche Beobachtung auch ich bei eigenen Untersuchungen machte[2]), so ist schon dadurch der Nachweis für die ursächliche Bedeutung der Menge des

[1]) W. Starlinger, diese Zeitschr. **114**. 1921, I. Mitteilung.

[2]) W. Starlinger, diese Zeitschr., II. Mitteilung. Im Erscheinen.

Fibrinogens erbracht, ebenso wie auch die stark verminderte Oberflächenspannung des Schwangerenplasmas für einen hohen Gehalt an hochmolekularen Bestandteilen spricht.

Dieser Anschauung sollen nun die folgenden Versuche, die an normalen und kranken Versuchspersonen durchgeführt wurden, weitere Stützen verschaffen.

Methodik: Das Blut wurde mittels paraffinierter Spritze entnommen und das Plasma durch Zusatz von 5proz. Natr. citr. im Verhältnis 1 : 4 (manchmal auch von 1proz. Natr. oxal. 1 : 4) und scharfes Zentrifugieren gewonnen. Die Ausfällung geschah durch die gebräuchlichen Methoden der Fibrinogenfällung: durch Zusatz von gesättigter NaCl-Lösung zum Plasma im Verhältnis von 1 : 1 oder von halbgesättigter $(NH_4)_2SO_4$-Lösung 1,5 : 3,5 oder durch Erwärmen auf 55° während 5 Minuten. Die Ablesung der Versuchsergebnisse erfolgte in den ersten 5—10 Minuten, da bei weiterem Warten sich die Unterschiede verwischen können.

Obwohl nun das Flockungsresultat bei allen Fällungsmethoden analog im Sinne gleicher Differenzen in Erscheinung tritt, so ist doch der Fällung durch NaCl bei weitem der Vorzug zu geben, da bei seiner Anwendung die deutlichsten und daher zum Vergleich am besten verwertbaren Unterschiede zur Beobachtung gelangen, was seine Ursachen darin findet, daß bei $(NH_4)_2SO_4$ und Erwärmen auf 55° die Fällung weit dichter, oft mehr schwaden- als flockenförmig auftritt und so feinere Unterschiede weniger gut erkennbar werden. Was die Verwendung des gerinnungshemmenden Salzes anbelangt, so möchte ich dem Citrat den Vorrang vor dem Oxalat einräumen, da bei Verwendung des letzteren die Flockung, obwohl sie die gleichen Ausschläge anzeigt, absolut genommen in geringerem Ausmaß ausgelöst wird und so ebenfalls weniger deutlich beurteilt werden kann.

Wenn also tatsächlich das Ausmaß der auftretenden Flockung einen Gradmesser des quantitativen Fibrinogengehaltes des jeweiligen Plasmas geben soll, so muß in Reihenversuchen ein ausgesprochener Parallelismus nachweisbar sein. Dies ist auch der Fall, wie ich in vielen vergleichenden Bestimmungen des Fibrinogengehaltes und Flockungsvermögens beobachten konnte. Tabelle I soll eine solche Versuchsreihe als typisches Beispiel wiedergeben.

Methodik: Die Blutentnahme erfolgte bei allen in jeweils einer Versuchsreihe zur Prüfung gelangenden Personen im Verlaufe von 24 Stunden, innerhalb welcher Zeit die Fibrinogenbestimmung nach der Methode

von Winternitz[1]) zur Durchführung kam, während die Ausflockung aller Plasmaproben gleichzeitig nach der letzten Blutentnahme angestellt wurde, da nur bei gleichzeitigem Vergleich sich feinere Unterschiede der Flockung objektiv beurteilen lassen; eine spontane Änderung des Stabilisationszustandes bei einer Aufbewahrungszeit von höchstens 24 Stunden im Eisschrank kann wohl ausgeschlossen werden.

Tabelle I.

Nr.	Eiweißwert des Plasmas in %	Eiweißwert des Serums in %	Fibrinogen in %	Ausfall der Flockung: 0,2 Citratplasma 0,2 ges. NaCl-Lösung
1	8,17	7,70	0,47	+ + + +
2	7,42	7.03	0,39	+ + +
3	8,60	8.28	0.32	+ +
4	8.99	8.69	0.30	+ +
5	8,15	7,85	0,30	+ +
6	6,77	6,49	0,28	+ +
7	7,70	7.48	0,22	+
8	8,79	8,58	0,21	+
9	8,09	7,90	0,19	±
10	7,37	7,20	0.17	±

Bei Betrachtung der Tabelle ist die ausgesprochene Abhängigkeit der Flockung von der Menge des Fibrinogens ohne weiteres ersichtlich. Bei einem Fibrinogengehalt von unter 0,2%, eine Menge, wie sie nach Untersuchungen an unserer Klinik der Norm entspricht[2]), ist wohl eine Trübung (±), aber noch keine Flockung nachweisbar; erst oberhalb dieser Grenze tritt eine feine Körnelung der Trübung (+) auf, entsprechend einem Fibrinogengehalte an der oberen Grenze der Norm, die als deutliche Flockung (+ +) erst oberhalb von ungefähr 0,3%, wo also die pathologische Vermehrung des Fibrinogens beginnt, in Erscheinung tritt, und zwar um so massiver, je gesteigerter der Fibrinogengehalt sich erweist.

In voller Übereinstimmung mit diesem Ergebnis steht das stufenweise Schwächerwerden der Flockung bei steigender Verdünnung mit Serum von der gleichen Blutprobe. Denn da eine physikalisch-chemische Zustandsänderung des Fibrinogens bei Zusatz von Serum der gleichen Abkunft kaum angenommen werden kann, andererseits aber sich das Flockungsvermögen entsprechend den oben angegebenen Grenzen ändert, muß wohl

[1]) Winternitz, Arch. f. Dermatol. u. Syphilis, Orig. 100. 1910.
[2]) Frisch, Brauers Beitr. z. Klin. d. Tuberkul. 48. 1921.

als Ursache der veränderten Flockung die veränderte Menge des Fibrinogens angesehen werden.

Tabelle II.

Versuchs-anordnung	Citratplasma	0,2	0,15	0,1	0,05	—
	Serum	—	0,05	0,1	0,15	0,2
	Fibrinogengehalt in %	0,47	0,35	0,23	0,12	—
	ges. NaCl-Lösung	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Ausfall der Flockung		++++	++	+	(+)	—

Ebenso gelingt es auch, die Flockung durch Ausschütteln des Plasmas mit Adsorbentien, die vorzugsweise die grobdispersen Eiweißkörper adsorbieren, zu verringern oder auch ganz aufzuheben, wofür folgender Versuch als Beleg dienen soll.

Methodik: Je 0,5 ccm Citratplasma und Citratserum, letzteres aus ersterem durch Erwärmen auf 55° während 10 Minuten und Abzentrifugieren des Fibrinogenniederschlages gewonnen, wurden mit je 0,005 g Kaolin, Bolus alba und Tierkohle versetzt, mit der Hand gut durchgeschüttelt, eine Stunde lang scharf zentrifugiert und die daraufhin abgehobene klare Flüssigkeit teils zur Anstellung der Flockung, teils zur Bestimmung des Brechungsvermögens (Pulfrichsches Eintauchrefraktometer) verwendet.

Tabelle III.

Citrat-plasma	Geschüttelt mit	Brechungs-vermögen	Citrat-serum	Geschüttelt mit	Brechungs-vermögen	Flockungsvermögen des Plasmas : 0,2 Pl. 0,2 ges. NaCl
0,5	—	58,9	0,5	—	55,9	+++
0,5	0,005 Kaolin	57,8	0,5	0,005 Kaolin	55,7	+
0,5	0,005 Bol. alba	57,5	0,5	0,005 Bol. alba	55,8	+
0,5	0,005 Tierkohle	57,8	0,5	0,005 Tierkohle	55,8	+

Während also das Brechungsvermögen des Plasmas durch Ausschütteln mit den erwähnten Adsorbentien wesentlich sinkt, ändert sich das des Serums fast gar nicht, so daß es wohl berechtigt ist, in diesen Substanzen hervorragende Fibrinogenadsorbentien zu sehen und die verringerte Flockung auf den verringerten Fibrinogengehalt zu beziehen.

Nachdem durch diese Versuche die überragende Wichtigkeit der **Quantität** des Fibrinogens wohl begründet erscheint, soll der nun folgende zweite Teil der Untersuchung sich mit den

Veränderungen der Flockung bei künstlicher Veränderung des physikalisch-chemischen Zustandes des Fibrinogens befassen.

Zur Methodik im allgemeinen sei nur bemerkt, daß zwischen dem flockungsändernden Zusatz und der eigentlichen Ausflockung im allgemeinen eine Reaktionszeit von einer halben Stunde bei Zimmertemperatur eingehalten wurde.

Ändert man die Reaktion des Plasmas nach der sauren oder alkalischen Richtung, so erfolgt bei beiden Eingriffen eine ausgesprochene Abschwächung der Fällung — vorausgesetzt, daß bei Zusatz von Säure dieser nicht so stark ist, um an sich schon fällend zu wirken — und zwar um so ausgesprochener, je energischer die Reaktionsänderung einsetzt.

Tabelle IV.

Versuchsanordnung	Citratplasma	0,2	0,2	0,2	0.2	0,2	0.2	0.2
	Zusatz	—	0,03 n/10-HCl	0,03 n/20-HCl	0,03 n/50-HCl	0.03 n/10-NaOH	0.03 n/20-NaOH	0,03 n/50-N[illegible]
	ges. NaCl-Lösg.	0,2	0.2	0,2	0,2	0.2	0.2	0.2
Ausfall der Flockung		++	+	+	++	+	+	+

Das gleiche Ergebnis ist durch Zusatz von Neutralsalzen verschiedener Art zu erzielen. Ich wählte dazu Salze, die in ihren Kationen und Anionen Gegenpole der Hofmeisterschen Reihen darstellen: einerseits NaCl und $CaCl_2$, andererseits NaCl und Na citr.; doch war eine Verschiedenheit der Wirkung nicht zu beobachten, obwohl die spurenweise Alkalescenz des Plasmas bekanntlich genügt, den Wirkungsmechanismus der Hofmeisterschen Reihen in Erscheinung treten zu lassen; vielmehr bewirkten alle 3 genannten Salze in gleicher Weise eine ausgesprochene Abschwächung der Flockung und zwar um so ausgiebiger, in je höherer Konzentration sie zur Anwendung gebracht wurden, wie Tabelle V zeigen soll.

Tabelle V.

Versuchsanordnung	Citratplasma	0,2	0.2	0.2	0,2	0.2	0,2	0.2
	Zusatz	—	0.03 5% NaCl	0,03 10% NaCl	0.03 5% $CaCl_2$	0.03 10% $CaCl_2$	0.03 5% NaCitr.	0.03 10% Na[illegible]
	ges. NaCl-Lösg.	0.2	0,2	0.2	0.2	0,2	0,2	0.2
Ausfall d. Flockung		+++	++	+	++	+	++	+

Auch durch erhöhte Temperaturen, die einige Zeit vor Anstellung der Flockungsreaktion auf das Plasma einwirken, kann eine starke Stabilisierung des Fibrinogens zustande kommen,

so daß von 3 Proben des gleichen Plasmas, von denen die erste zwischen Blutentnahme und Ausflockung im Eisschrank, die zweite bei Zimmertemperatur und die dritte im Brutschrank aufgehoben wird, die stärkste Flockung bei der ersten, die schwächste bei der dritten zu beobachten ist.

Tabelle VI.

Versuchs-anordnung	Citratplasma	0,2	0,2	0,2
	Einwirkende Temperatur durch 12 Stunden	5°	20°	37°
	ges. NaCl-Lösung	0,2	0,2	0,2
Ausfall der Flockung		+++	++	+

Wenn nun darangegangen werden soll, ein ursächliches Moment der Fibrinogenstabilisierung durch Säure, Alkali, Neutralsalz und Wärme zu finden, so möchte ich in erster Linie auf den hydrolytischen Eiweißabbau hinweisen, der — schon an und für sich in geringem Ausmaß im Serum[1]) und ebenso auch im Plasma vorhanden — sowohl im sauren und alkalischen Medium wie auch im hypertonischen eine ausgesprochene Förderung erhält, ebenso wie er auch unter dem jede chemische Reaktion begünstigenden Einfluß erhöhter Temperatur eine Steigerung erfahren wird. Daneben, aber von jedenfalls untergeordneter Bedeutung, mag auch die durch den sicher nur geringen Fibrinogenabbau selbst bedingte Verminderung des Fibrinogengehaltes in Betracht zu ziehen sein.

Wenn nun tatsächlich die dabei entstehenden Spaltprodukte der Bluteiweißkörper die Fähigkeit besitzen, das Fibrinogen vor dem Ausfallen zu schützen, so muß einerseits die Einwirkung eines Agens von intensiver Abbauwirkung, andererseits der unmittelbare Zusatz von Eiweißspaltstücken das gleiche Ergebnis erkennen lassen. Zu diesem Zwecke brachte ich einerseits Pepsin in Anwendung, andererseits setzte ich direkt Abbauprodukte in Form von Witte-Pepton zu.

Das Versuchsergebnis war immer derart, daß beide Eingriffe die Flockung entweder überhaupt aufhoben oder bei sehr fibrinogenreichen Plasmen zum mindesten sehr stark abschwächten.

[1]) Lange, diese Zeitschr. **61.** 1914. — Plaut, Münch. med. Wochenschr. **5.** 1914. — Friedemann und Schönfeld, Berl. klin. Wochenschr. **8.** 1914 u. a.

Tabelle VII.

Versuchs-anordnung	Citratplasma	0,2	0,2	0,2
	Zusatz	0,005 Pepsin, enthaltend 10% salzs. Betain	0,005 Pepton-Witte	—
	ges. NaCl-Lösung	0,2	0,2	0,2
Ausfall der Flockung		+	±	+ −

Haben nun im vorausgehenden Eingriffe, die mit einer Anreicherung von Eiweißabbauprodukten verbunden sind, eine erhebliche Hemmung derselben zur Folge gehabt, so bleibt es übrig, Substanzen zu finden, die beim Zusatz zum Plasma eine Labilisierung des Fibrinogens in Form einer verstärkten Flockung desselben bedingen. Eine solche Wirksamkeit ließen vor allem Agar-Agar, Gummi acaciae und Gelatine einerseits, Glykokoll, als einfachster Vertreter der Aminosäuren, andererseits erkennen, was ja hinsichtlich der Labilisierung der Serumglobuline für Agar-Agar (Hirschfeld-Klinger) und Aminosäuren (Much-Embden) längst bekannt ist.

Tabelle VIII.

Versuchs-anordnung	Citratplasma	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	Zusatz	—	0,005 Gummi	0,005 Gelatine	0,005 Agar	0,005 Glykokoll
	ges. NaCl-Lösung	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Ausfall der Flockung		+ +	+ + +	+ + +	+ + + +	+ + + +

Die Methodik wurde für Gummi, Gelatine und Agar entsprechend der in Tabelle III angegebenen Weise eingehalten.

Die Frage ist nun die, wie wir uns den Wirkungsmechanismus dieser Stoffe vorzustellen haben, und zu diesem Zwecke wird es sich als notwendig erweisen, eine theoretische Vorstellung, in deren Rahmen sich die festgesetzten Resultate zwanglos einfügen lassen, kurz auszuführen, ohne auf die anderen Anschauungen über das Wesen des Flockungsvorganges an sich hier näher eingehen zu können.

Nach Herzfeld und Klinger[1]) bilden die wasserlöslichen niederen Eiweißabbauprodukte die Lösungsvermittler der an sich unlöslichen, niedrigdispersen Eiweißkolloide, indem sie sich an deren Oberflächen anlagern und durch ihr Wasserbindungsvermögen um jedes einzelne Teilchen gewissermaßen eine Wasserhülle schaffen, die die Aggregierung mit den anderen Teilchen

[1]) Herzfeld und Klinger, diese Zeitschr. 83. 1917.

verhindert. Alle Einflüsse, die die stabilisierenden Abbauprodukte entfernen oder vermindern, flocken die Eiweißkörper aus, alle Eingriffe, die diese Spaltstücke anreichern, fördern die Stabilität der Lösung.

In voller Übereinstimmung damit konnten die im vorigen ausgeführten Versuche die Stabilisierung des Fibrinogens durch Anreicherung von Eiweißabbauprodukten zeigen, und wenn nun an die Beantwortung der Frage nach der Wirkungsweise der labilisierenden Eingriffe geschritten werden soll, so ist wohl die Annahme am wahrscheinlichsten, daß Agar, Gummi und Gelatine durch Adsorption eines Teiles der Eiweißspaltstücke an die eigenen Oberflächen die Fibrinogenteilchen an solchen verarmen machen und dadurch ihre Verklumpung fördern. Anders dürfte es sich bei der Verstärkung der Flockung durch Glykokoll verhalten: Da die Eiweißkolloide am besten durch die in der Abbaureihe am nächsten stehenden Spaltstücke in Lösung erhalten werden, also das kolloidale Eiweiß durch noch nicht dialysable Polypeptide, diese durch dialysierbare, aber noch biurete Spaltstücke und diese schließlich durch abiurete Peptide und Aminosäuren, so würde die Annahme, daß ein hoher Gehalt an Aminosäuren die Löslichkeit der zur Stabilisierung der grobdispersen Eiweißkolloide in erster Linie notwendigen, noch relativ hochmolekularen Spaltstücke derart erhöht, daß sie nicht mehr an die Oberflächen der groben Kolloide gehen und dadurch deren Stabilität nicht mehr aufrechterhalten können, nicht unbegründet erscheinen.

Wie sehr nun auch auf diese Weise die Flockbarkeit des Fibrinogens im Reagensglase durch Stabilitätsstörung verändert werden kann, so soll doch nochmals betont werden, daß im unbeeinflußten Plasma ein so differentes Verhalten der Fibrinogenstabilisierung unabhängig von der Quantität des Fibrinogens nur sehr selten in Erscheinung tritt; dies geht daraus hervor, daß nur in Ausnahmefällen ein fibrinogenreiches Plasma eine relativ ungenügende Flockung oder umgekehrt ein fibrinogenarmes eine zu ausgiebige Flockung beobachten läßt, so daß man auf eine besonders starke oder schwache Stabilisierung schließen müßte.

Zusammenfassung.

1. Da die Ausflockung des Fibrinogens durch die gebräuchlichen Methoden erst bei einem Minimalgehalt von ca. 0,2% des Blut-

plasmas an solchem in Erscheinung tritt und parallel dem zunehmenden Fibrinogengehalt an Intensität gewinnt, welches Verhältnis auch bei steigender Verdünnung des Plasmas durch zugehöriges Serum dargetan werden kann, ebenso wie die Fällung durch teilweise Entfernung des Fibrinogens mittels exquisiter Fibrinogenadsorbentien: Kaolin, Bolus alba, Tierkohle abgeschwächt oder ganz aufgehoben wird, muß das Flockungsvermögen des Blutplasmas als vor allem durch seinen quantitativen Gehalt an Fibrinogen bedingt angesehen werden und kann daher als Maß desselben gelten.

2. Damit steht in vollem Einklang, daß im nativen Plasma Differenzen des Stabilitätszustandes in dem Sinne, daß ein fibrinogenreiches Plasma eine zu geringe Flockbarkeit aufzuweisen hätte und umgekehrt, nur ausnahmsweise zur Beobachtung gelangen. Dagegen gelingt es bei künstlicher Beeinflussung durch die verschiedensten Eingriffe die Stabilisierung des Plasmas erheblich zu ändern, indem eine deutliche Hemmung der Flockung auf Zusatz von Säure, Alkali, Neutralsalz einerseits, bei Anwendung von erhöhter Temperatur, Pepsin, Witte-Pepton anderseits festgestellt werden kann, während Agar, Gummi, Gelatine und Glykokoll eine ausgesprochene Verstärkung der Flockung zur Folge haben.

3. Da sich diese Ergebnisse zwanglos in den Rahmen der Anschauungen Herzfelds und Klingers über den Lösungsvorgang kolloidalen Eiweißes einfügen lassen, wurde eine Deutung auf dieser Basis versucht.

Nachtrag bei der Korrektur:

In diesem Zusammenhange sei auch auf die erst während der Korrektur erschienene Arbeit v. Oettingens[1]) über die Senkungsgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen hingewiesen, auf die andernorts ausführlich zurückzukommen sein wird.

---

[1]) v. Oettingen, diese Zeitschrift 118. 1921.

Über die Dismutation verschiedener Aldehyde durch Hefe.

Von

H. Kumagawa.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 20. Juli 1921.)

Durch die Untersuchung von Battelli und Stern (1910) ist bekannt geworden, daß tierische Organe die Fähigkeit besitzen, Aldehyde nach dem Schema der Cannizzaroschen Reaktion umzulagern; Parnas zeigte die Verbreitung dieses Vorgangs, der sich an verschiedenen einfachen aliphatischen und aromatischen Aldehyden abspielen kann. Für die physiologisch wichtigen Ketonaldehyde vom Typus des Methylglyoxals und seiner Homologen taten Neuberg und Dakin dar, daß sie einer ähnlichen Umwandlung unterliegen können, der Hydratation zur entsprechenden Oxysäure; dies ist nichts anderes, als eine innere Cannizzarosche Umlagerung. Während die vorerwähnten Untersuchungen mit tierischem Material ausgeführt sind, war es von Interesse, zu untersuchen, ob auch Vegetabilien zur Verwirklichung einer solchen Dismutation allgemeiner befähigt sind. Neuberg und Kerb[1]) haben zuerst darauf hingewiesen, daß die Hefe Acetaldehyd zu dismutieren vermöge, und zu dem gleichen Ergebnis ist bald darauf S. Kostytschew[2]) gelangt. Die dismutierende Wirkung der Hefe erstreckt sich aber nicht nur auf künstlich zugefügte Aldehyde, sondern auch auf Carbonylverbindungen, die im Stoffwechsel der Hefe entstehen. Denn die dritte Vergärungsform, die Neuberg mit Hirsch aufgefunden und mit Ursum als weitverbreitet nachgewiesen hat[3]), beruht darauf, daß bei alkalischer Reaktion, d. h. wohl bei einer für die Entfaltung der Mutase günstigen Hydroxylionenkonzentration, der

[1]) C. Neuberg und Joh. Kerb, diese Zeitschr. **58**, 169. 1913; Ch. C. **1914**. I. 279.

[2]) H. **89**, 367. 1914; Ch. C. **1914**, I. 1514.

[3]) Diese Zeitschr. **96**, 175 und **100**, 304. 1919; **110**, 193. 1920.

im Verlaufe der alkoholischen Zuckerspaltung auftretende Acetaldehyd zu Essigsäure und Äthylakohol disloziert wird. Dieselben Autoren haben bereits beobachtet, daß auch die Disproportionierung zugefügten Aldehyds bei bicarbonat-alkalischer Reaktion schneller und vollständiger vonstatten gehen kann als bei dem natürlichen sauren Milieu normaler Gäransätze. In Anbetracht des biochemischen Interesses, das die Dismutationsreaktion somit für den Ablauf animalischer und vegetabilischer Stoffwechselvorgänge erlangt hat, schien es mir wünschenswert, andere Aldehyde auf die Fähigkeit zu prüfen, unter dem Einfluß der Hefe in bicarbonat-alkalischer Umgebung eine Umlagerung zu erfahren.

Meine Untersuchungen erstrecken sich auf 3 aliphatische und einen aromatischen Vertreter der Aldehyde: auf Isobutylaldehyd, Isovaleraldehyd und Önanthol sowie auf Benzaldehyd. Bekanntlich sind die Aldehyde der Fettreihe im allgemeinen nicht oder nur spurenhaft zu einer Dismutation in wässeriger Lösung befähigt; die Aldehyde der Benzolreihe gehen diese Reaktion, wenigstens in ätzalkalischer Lösung, leicht ein. Es ergab sich, daß die 4 genannten verschiedenen Aldehyde durch Hefe in Gegenwart von Natriumbicarbonat dismutiert werden. Die Umlagerung des Benzaldehyds, die in einer wässerigen Lösung von doppeltkohlensaurem Natrium an sich nur geringfügig ist, wird durch das Hefeferment wesentlich verstärkt.

Theoretisch hätte man zu erwarten, daß aus 2 Molekülen Aldehyd je 1 Molekül des entsprechenden Alkohols und der zugehörigen Säure hervorgeht. Dieses Verhältnis kommt jedoch in den Versuchen nicht ganz scharf zum Ausdruck. Es entstand zumeist mehr Alkohol als Säure. Der Grund dafür ist leicht ersichtlich. In einer größeren Zahl von Arbeiten haben Neuberg und Mitarbeiter vor Jahren festgestellt, daß in Gegenwart gärenden Zuckers Aldehyde eine phytochemische Reduktion[1]) zu dem entsprechenden Alkohol erleiden können, die nicht nach dem Schema der Cannizzaroschen Reaktion erfolgt, indem gar keine oder nur eine Spur Säure neben sehr viel Alkohol (bis 84% der Theorie) gebildet wird. Der für diese Hydrierung benötigte Wasserstoff wird in letzter Linie dem umgesetzten Zucker entnommen. Neuberg hat mit Steenbock, Ringer und E. Kerb[2]) aber

[1]) C. Neuberg und Mitarbeiter, diese Zeitschr. 1912—1920.

[2]) Diese Zeitschr, **52**, 503. 1913; **91**, 133; **92**, 98, 99, **114**. 1918.

gefunden, daß auch ohne Ablauf einer eigentlichen Gärung phytochemische Reduktionen vor sich gehen, indem reduktionstüchtige Bestandteile der Hefe diese hydrierende Funktion übernehmen können. Zum Teil handelt es sich dabei ebenfalls um Kohlenhydrate, die in Form von Polysacchariden (sog. Hefeglykogen bzw. -gummi) in den Saccharomyceten vorgebildet sind und bei der Digestion einer Selbstgärung unterliegen, z. T. aber auch um andere Zellsubstanzen. Ich glaube, zumal ich reichlich Hefe angewendet habe, damit eine genügende Erklärung für das Überwiegen der Alkohole bei der Dismutation der untersuchten Aldehyde geben zu können.

Versuchsteil.

Was die Ausführung der Versuche anlangt, so bin ich in allen Fällen folgendermaßen vorgegangen:

Zu einer Suspension von 500 g Hefe in 1 Liter 1 proz. Natriumbicarbonatlösung wurde die zu untersuchende Aldehydmenge (10 g) gegeben und das Gemisch gründlich durchgeschüttelt. Wegen der starken antiseptischen Kraft der verwendeten Aldehyde erübrigte sich die Zugabe eines besonderen Desinfektionsmittels. Das betreffende Gemenge blieb im Brutschrank bei 35° eine Reihe von Tagen stehen, bis der Geruch des zugefügten Aldehyds verschwunden oder schwach geworden war. Das Digestionsgemisch wurde dann nach guter Durchschüttelung geteilt. Die eine Hälfte diente unmittelbar zur Bestimmung des gebildeten Alkohols. Sie wurde nicht filtriert, da der betreffende, in Wasser schwerlösliche Alkohol in den Hefezellen verteilt sein konnte; sie wurde vielmehr mit Wasserdampf destilliert und zwar bei der vorhandenen bicarbonat-alkalischen Reaktion. [Bei Benzaldehyd (siehe später) mußte ich anders verfahren.] Aus der übergegangenen, durch Öltropfen getrübten Flüssigkeit wurde durch wiederholte Rektifikation der entstandene Alkohol angereichert und dann mit Äther extrahiert. Der ätherische Auszug wurde mit Natriumsulfat entwässert, in bekannter Weise vom Lösungsmittel befreit und am Birektifikator destilliert. So wurde unmittelbar der aus dem Aldehyd entstandene Alkohol gewonnen und als solcher gewogen.

Für die Ermittelung der Säure mußte ich einen anderen Weg einschlagen. Hier erwies sich eine Filtration als notwendig, weil beim Abtreiben der aus dem Aldehyd gebildeten Säure mit Wasserdampf

vom hefehaltigen Rückstand stets fremde Säurebestandteile mit übergehen. Die Filtration konnte auch unbedenklich vorgenommen werden, weil ja die entstandene Säure als Natronsalz in Lösung gegangen war oder übergeführt wurde. Ein aliquoter, durch Filtration gewonnener Anteil wurde alsdann mit Schwefelsäure kongosauer gemacht und mit Wasserdampf destilliert. Die Menge der übergetriebenen flüchtigen Säure wurde durch Titration mit $^n/_{10}$-Natronlauge angenähert festgestellt. Zur Identifizierung der gebildeten Säure wurde das gesamte Wasserdampfdestillat nach Zugabe von überschüssigem Natriumcarbonat auf dem Wasserbad zur Trockene gedampft und der hinterbliebene Salzkuchen erschöpfend mit Alkohol extrahiert. In allen Fällen war Formiat in dieser Salzmasse vorhanden und mußte deshalb zerstört werden. Hierzu wählte ich, da Chromsäure auf verschiedene Fettsäuren nicht ohne Einwirkung ist, das Quecksilbersulfatverfahren von Neuberg und Brasch[1]). Durch diese Behandlung wird beim Kochen in schwach saurer Lösung am Rückflußkühler die Ameisensäure oxydiert. Alsdann wurde die restierende, aus dem Aldehyd entstandene Säure von neuem mit Wasserdampf übergetrieben, wie vorher beschrieben, mit Natriumcarbonat in das Alkalisalz verwandelt und nach völligem Eindampfen mit Alkohol ausgezogen. Beim Einengen der weingeistigen Extrakte hinterblieb das Natriumsalz als weiße, mehr oder minder deutlich krystallinische Masse, aus der dann durch Umsetzung mit Silbernitrat bei ganz schwach salpetersaurer Reaktion das Silbersalz bereitet wurde. Nur bei diesem Vorgehen erhält man farblose, sich nicht schwärzende Silberverbindungen, die dann bei der Analyse befriedigend stimmende Werte lieferten. Bevor ich diese Arbeitsweise ausprobiert hatte, erhielt ich zwar leicht die entsprechenden Alkohole, aber nur ungenau stimmende Werte für die zugehörigen Säuren. Ich beschränke mich darauf, die Versuche zu beschreiben, die ich als gut gelungen bezeichnen kann.

1. Isovaleraldehyd.

1000 ccm 1 proz. Lösung von doppeltkohlensaurem Natron, 500 g Hefe Senst, 10 g Isovaleraldehyd. Nach 14tägiger Digestion hatte der Geruch des Valeraldehyds dem von Amylalkohol Platz gemacht und die Lösung reagierte schwach sauer. Ihre Menge

[1]) C. Neuberg und W. Brasch, diese Zeitschr. **13**, 302. 1908.

betrug 1430 ccm. 715 ccm wurden mit Sodalösung wieder alkalisiert und mit Dampf destilliert. Isoliert wurden 1,72 g Amylalkohol vom Siedepunkt 126—134°, daneben waren kleine Mengen niedriger und höher kochender Produkte vorhanden.

715 ccm wurden mit Natriumcarbonat erwärmt und filtriert und der auf dem Filter bleibende Rückstand mit reichlich warmem Wasser ausgewaschen. Das gesamte Filtrat, wurde mit Schwefelsäure angesäuert und mit Wasserdampf auf 3830 ccm destilliert. Die Menge der flüchtigen Säure betrug berechnet als Valeriansäure 3,50 g. Davon abzuziehen ist die Menge Säure, welche die Hefe bekanntlich allein entwickelt. Zu ihrer Bestimmung wurde ein genau entsprechender Ansatz mit 500 g Hefe in 1000 ccm 1 proz. Bicarbonatlösung unter Zugabe von 10 g Toluol als Antisepticum vorgenommen. Auf die halbe Menge berechnet sich eine Acidität = 52 ccm $^n/_{10}$-Lauge, entsprechend 0,53 g Valeriansäure.

Die wirklich als reines Silbersalz isolierte Menge Valeriansäure war jedoch nach Beseitigung der Ameisensäure und nach Vornahme der vorhin erwähnten Prozeduren geringer. Erhalten wurden 1,23 g valeriansaures Silber. Das Vorliegen von Valeriansäure ergibt sich aus der Silberanalyse:

0,2524 g Substanz: 0,1306 g Ag = 51,74%; $C_5H_9O_2Ag$: ber. Ag = 51,67%.

2. Isobutylaldehyd.

Ein genau gleicher Ansatz mit Isobutylaldehyd lieferte 0,86 g Isobutylalkohol[1]) und 1,04 g Isobuttersäure.

0,3023 g Substanz: 0,1683 g Ag = 55,64%; $C_4H_7O_2Ag$: ber. Ag = 55,38%.

3. Önanthol.

Isoliert wurden 1,72 g Heptylalkohol und 1,03 g Säure, die jedoch nicht rein, sondern nach Zerstörung der Ameisensäure allem Anschein nach mit Essigsäure verunreinigt gewesen ist.

4. Benzaldehyd.

Wegen der bekannten Empfindlichkeit des Benzaldehyds gegen Alkali habe ich auch die Abdestillation des Benzylalkohols erst nach der Ansäuerung mit Schwefelsäure vorgenommen. Es

[1]) Wegen der größeren Wasserlöslichkeit war hier die Ausbeute an Isobutylalkohol geringer.

ging dann ein Gemisch von Benzylalkohol mit Benzoesäure über. Dasselbe wurde aus dem Wasserdampfdestillat mit Äther ausgeschüttelt und mit Sodalösung gewaschen. Im Äther hinterblieb der Benzylalkohol.

Zur genauen Bestimmung der Benzoesäure wurde das alkalische Digestionsgemisch filtriert, angesäuert und im Faust-Heimschen Verdunstungskasten bei 30° eingetrocknet. Der restierende Salzrückstand wurde, da die Extraktion mit Äther zu starke Emulsion gab, mit etwas verdünntem Alkohol ausgezogen. Der nach vorsichtigem Verdampfen des Weingeistes erhaltene Rückstand roch deutlich nach Benzoesäureestern und wurde daher durch Kochen mit Natronlauge verseift. Durch Ausschütteln nunmehr mit Äther wurden die alkoholischen Bestandteile entfernt, und dann wurde durch erneute Extraktion aus saurer Lösung die Benzoesäure abgetrennt, die durch vorsichtiges Verdampfen des Äthers bei niederer Temperatur zurückblieb und durch Aufstreichen auf Ton von Spuren anhaftenden Öls befreit werden konnte.

Bei diesem Vorgehen wurden gewonnen aus 10 g Benzaldehyd 2,21 g Benzylalkohol vom Siedepunkte 202—210° und 1,01 g Benzoesäure vom Schmelzpunkt 118°.

In einem Kontrollversuch, der mit gleichen Mengen, aber ohne Hefe und unter Zugabe von Toluol als Antisepticum angestellt war, konnte an Benzylalkohol keine bemerkenswerte Menge, von Benzoesäure immerhin 0,5 g isoliert werden. Ob diese durch eine Cannizzarosche Reaktion oder durch Autoxydation entstanden sind, bleibe dahingestellt; jedenfalls war ihre Quantität geringer als im Ansatz mit Hefe.

Über das Verhalten der inaktiven Äpfelsäure im Organismus des Hundes und Kaninchens.

Von

M. Tomita.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 21. Juli 1921.)

Vor mehreren Jahren hat Ohta ermittelt, daß die Äpfelsäure gleich anderen Pflanzensäuren entgegen den Anschauungen Liebigs nicht vollständig im Organismus der Tiere verbrennt, sondern zum Teil unverändert ausgeschieden wird.[1]) Zum Nachweis unangegriffener Äpfelsäure im Harn bediente sich der genannte Autor des Umstandes, daß die an sich schwach drehende Äpfelsäure ein starkes Rotationsvermögen erlangt, wenn sie mit einer essigsauren Uranlösung im richtigen Verhältnis versetzt wird. Für die Besonderheiten des Verfahrens, welche durch die Bestandteile des Harns bedingt sind, verweise ich auf die Angaben von Ohta und bemerke noch, daß seine Ergebnisse von Wise[2]) bestätigt worden sind.

Da sich mit der Uranmethode sehr kleine Mengen optisch aktiver Äpfelsäure im Harn erkennen und bestimmen lassen, benutzte ich auf Veranlassung von Prof. Neuberg das Verfahren zur Untersuchung der Frage, wie sich racemisch Äpfelsäure im Organismus des Kaninchens und Hundes verhält, d. h. ob die Verbindung asymmetrisch abgebaut wird, oder ob ihre Komponenten gleichmäßig angegriffen werden. Während nämlich viele inaktive Substanzen im Tierkörper partielle Spaltung und damit optische Aktivierung erfahren, sind auch die umgekehrten Fälle bekannt, d. h. simultane Verarbeitung beider Antipoden. Meine Untersuchungen haben ergeben, daß die Äpfelsäure zu den in gewissem Umfange asymmetrisch zerlegbaren Verbindungen gehört.

---

[1]) K. Ohta, diese Zeitschr. **44**, 481. 1912.

[2]) L. E. Wise, Chem. Centralbl. **1917**. I. 894.

vom hefehaltigen Rückstand stets fremde Säurebestandteile mit übergehen. Die Filtration konnte auch unbedenklich vorgenommen werden, weil ja die entstandene Säure als Natronsalz in Lösung gegangen war oder übergeführt wurde. Ein aliquoter, durch Filtration gewonnener Anteil wurde alsdann mit Schwefelsäure kongosauer gemacht und mit Wasserdampf destilliert. Die Menge der übergetriebenen flüchtigen Säure wurde durch Titration mit $^{n}/_{10}$-Natronlauge angenähert festgestellt. Zur Identifizierung der gebildeten Säure wurde das gesamte Wasserdampfdestillat nach Zugabe von überschüssigem Natriumcarbonat auf dem Wasserbad zur Trockene gedampft und der hinterbliebene Salzkuchen erschöpfend mit Alkohol extrahiert. In allen Fällen war Formiat in dieser Salzmasse vorhanden und mußte deshalb zerstört werden. Hierzu wählte ich, da Chromsäure auf verschiedene Fettsäuren nicht ohne Einwirkung ist, das Quecksilbersulfatverfahren von Neuberg und Brasch[1]). Durch diese Behandlung wird beim Kochen in schwach saurer Lösung am Rückflußkühler die Ameisensäure oxydiert. Alsdann wurde die restierende, aus dem Aldehyd entstandene Säure von neuem mit Wasserdampf übergetrieben, wie vorher beschrieben, mit Natriumcarbonat in das Alkalisalz verwandelt und nach völligem Eindampfen mit Alkohol ausgezogen. Beim Einengen der weingeistigen Extrakte hinterblieb das Natriumsalz als weiße, mehr oder minder deutlich krystallinische Masse, aus der dann durch Umsetzung mit Silbernitrat bei ganz schwach salpetersaurer Reaktion das Silbersalz bereitet wurde. Nur bei diesem Vorgehen erhält man farblose, sich nicht schwärzende Silberverbindungen, die dann bei der Analyse befriedigend stimmende Werte lieferten. Bevor ich diese Arbeitsweise ausprobiert hatte, erhielt ich zwar leicht die entsprechenden Alkohole, aber nur ungenau stimmende Werte für die zugehörigen Säuren. Ich beschränke mich darauf, die Versuche zu beschreiben, die ich als gut gelungen bezeichnen kann.

1. Isovaleraldehyd.

1000 ccm 1 proz. Lösung von doppeltkohlensaurem Natron, 500 g Hefe Senst, 10 g Isovaleraldehyd. Nach 14tägiger Digestion hatte der Geruch des Valeraldehyds dem von Amylalkohol Platz gemacht und die Lösung reagierte schwach sauer. Ihre Menge

[1]) C. Neuberg und W. Brasch, diese Zeitschr. **13**, 302. 1908.

betrug 1430 ccm. 715 ccm wurden mit Sodalösung wieder alkalisiert und mit Dampf destilliert. Isoliert wurden 1,72 g Amylalkohol vom Siedepunkt 126—134°, daneben waren kleine Mengen niedriger und höher kochender Produkte vorhanden.

715 ccm wurden mit Natriumcarbonat erwärmt und filtriert und der auf dem Filter bleibende Rückstand mit reichlich warmem Wasser ausgewaschen. Das gesamte Filtrat, wurde mit Schwefelsäure angesäuert und mit Wasserdampf auf 3830 ccm destilliert. Die Menge der flüchtigen Säure betrug berechnet als Valeriansäure 3,50 g. Davon abzuziehen ist die Menge Säure, welche die Hefe bekanntlich allein entwickelt. Zu ihrer Bestimmung wurde ein genau entsprechender Ansatz mit 500 g Hefe in 1000 ccm 1 proz. Bicarbonatlösung unter Zugabe von 10 g Toluol als Antisepticum vorgenommen. Auf die halbe Menge berechnet sich eine Acidität = 52 ccm $^{n}/_{10}$-Lauge, entsprechend 0,53 g Valeriansäure.

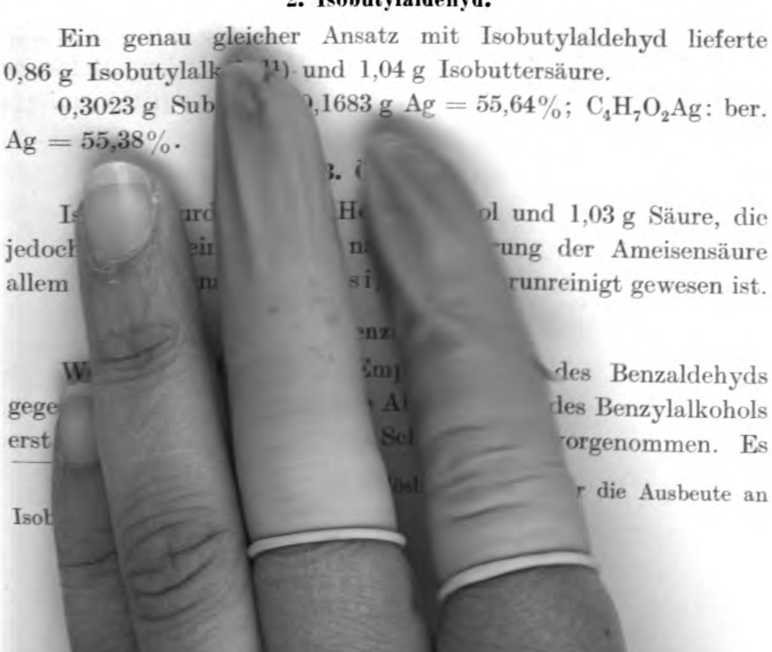
Die wirklich als reines Silbersalz isolierte Menge Valeriansäure war jedoch nach Beseitigung der Ameisensäure und nach Vornahme der vorhin erwähnten Prozeduren geringer. Erhalten wurden 1,23 g valeriansaures Silber. Das Vorliegen von Valeriansäure ergibt sich aus der Silberanalyse:

0,2524 g Substanz: 0,1306 g Ag = 51,74%; $C_5H_9O_2Ag$: ber. Ag = 51,67%.

2. Isobutylaldehyd.

Ein genau gleicher Ansatz mit Isobutylaldehyd lieferte 0,86 g Isobutylalk... [1]) und 1,04 g Isobuttersäure.

0,3023 g Sub... ,1683 g Ag = 55,64%; $C_4H_7O_2Ag$: ber. Ag = 55,38%.



3. ...

I... ol und 1,03 g Säure, die jedoc... ung der Ameisensäure allem ... runreinigt gewesen ist.

W... des Benzaldehyds gege... des Benzylalkohols erst... orgenommen. Es

... r die Ausbeute an Isob...

ging dann ein Gemisch von Benzylalkohol mit Benzoesäure über. Dasselbe wurde aus dem Wasserdampfdestillat mit Äther ausgeschüttelt und mit Sodalösung gewaschen. Im Äther hinterblieb der Benzylalkohol.

Zur genauen Bestimmung der Benzoesäure wurde das alkalische Digestionsgemisch filtriert, angesäuert und im Faust-Heimschen Verdunstungskasten bei 30° eingetrocknet. Der restierende Salzrückstand wurde, da die Extraktion mit Äther zu starke Emulsion gab, mit etwas verdünntem Alkohol ausgezogen. Der nach vorsichtigem Verdampfen des Weingeistes erhaltene Rückstand roch deutlich nach Benzoesäureestern und wurde daher durch Kochen mit Natronlauge verseift. Durch Ausschütteln nunmehr mit Äther wurden die alkoholischen Bestandteile entfernt, und dann wurde durch erneute Extraktion aus saurer Lösung die Benzoesäure abgetrennt, die durch vorsichtiges Verdampfen des Äthers bei niederer Temperatur zurückblieb und durch Aufstreichen auf Ton von Spuren anhaftenden Öls befreit werden konnte.

Bei diesem Vorgehen wurden gewonnen aus 10 g Benzaldehyd 2,21 g Benzylalkohol vom Siedepunkte 202—210° und 1,01 g Benzoesäure vom Schmelzpunkt 118°.

In einem Kontrollversuch, der mit gleichen Mengen, aber ohne Hefe und unter Zugabe von Toluol als Antisepticum angestellt war, konnte an Benzylalkohol keine bemerkenswerte Menge, von Benzoesäure immerhin 0,5 g isoliert werden. Ob diese durch eine Cannizzarosche Reaktion oder durch Autoxydation entstanden sind, bleibe dahingestellt; jedenfalls war ihre Quantität geringer als im Ansatz mit Hefe.

Über das Verhalten der inaktiven Äpfelsäure im Organismus des Hundes und Kaninchens.

Von

M. Tomita.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 21. Juli 1921.)

Vor mehreren Jahren hat Ohta ermittelt, daß die Äpfelsäure gleich anderen Pflanzensäuren entgegen den Anschauungen Liebigs nicht vollständig im Organismus der Tiere verbrennt, sondern zum Teil unverändert ausgeschieden wird.[1]) Zum Nachweis unangegriffener Äpfelsäure im Harn bediente sich der genannte Autor des Umstandes, daß die an sich schwach drehende Äpfelsäure ein starkes Rotationsvermögen erlangt, wenn sie mit einer essigsauren Uranlösung im richtigen Verhältnis versetzt wird. Für die Besonderheiten des Verfahrens, welche durch die Bestandteile des Harns bedingt sind, verweise ich auf die Angaben von Ohta und bemerke noch, daß seine Ergebnisse von Wise[2]) bestätigt worden sind.

Da sich mit der Uranmethode sehr kleine Mengen optisch aktiver Äpfelsäure im Harn erkennen und bestimmen lassen, benutzte ich auf Veranlassung von Prof. Neuberg das Verfahren zur Untersuchung der Frage, wie sich racemisch Äpfelsäure im Organismus des Kaninchens und Hundes verhält, d. h. ob die Verbindung asymmetrisch abgebaut wird, oder ob ihre Komponenten gleichmäßig angegriffen werden. Während nämlich viele inaktive Substanzen im Tierkörper partielle Spaltung und damit optische Aktivierung erfahren, sind auch die umgekehrten Fälle bekannt, d. h. simultane Verarbeitung beider Antipoden. Meine Untersuchungen haben ergeben, daß die Äpfelsäure zu den in gewissem Umfange asymmetrisch zerlegbaren Verbindungen gehört.

---

[1]) K. Ohta, diese Zeitschr. **44**, 481. 1912.

[2]) L. E. Wise, Chem. Centralbl. **1917**. I. 894.

Die benötigte inaktive Äpfelsäure stellte ich aus Maleinsäure nach der vortrefflichen Vorschrift von E. Biilmann[1]) her, und zwar durch Mercurierung der Maleinsäure mittels Quecksilberoxydacetats und nachfolgende Zersetzung des Additionsproduktes, wobei unter Wasseraufnahme d, l-Äpfelsäure entsteht. Zu den Tierversuchen diente die reine krystallisierte Säure, welche mit Sodalösung bzw. Natronlauge in das neutrale Salz verwandelt worden war. Das Natriummalat wurde den Tieren subcutan beigebracht.

Die Bestimmung der Äpfelsäure im Urin gestaltete sich dann folgendermaßen:

Der Harn wurde zunächst auf Zucker geprüft, der als Folge des Eingriffes bei Kaninchen mehrfach auftrat. Der Harn wurde in diesen Fällen mit wenig Reinzuchthefe[2]) im Brutschrank vergoren, bis eine kleine Probe keine reduzierende Substanz mehr aufwies. Alsdann wurden 10 ccm des zuckerfreien Harns mit einer durch Uranylacetat vollkommen gesättigten Essigsäure, wie angegeben, versetzt. Die leicht filtrierende Lösung kann sofort optisch geprüft werden. Der bei unmittelbarer Polarisation kaum drehende Harn nahm in allen Fällen unter dem Einfluß des Uranylsalzes eine erhebliche Rotation an. Dieselbe wurde in einem Quarzkeilapparat festgestellt, der bei Auerlicht und im 2-dcm-Rohr direkt Prozente Glucose anzeigte. Da die spezifischen Drehungen von Uran-Äpfelsäure und Glucose bei weißem Licht im Verhältnis von 515 : 52,6 stehen, so sind die abgelesenen Werte durch 9,78 zu dividieren, um die in 100 ccm Flüssigkeit vorhandenen Gramme aktiver Äpfelsäure zu finden.

A. Versuche am Kaninchen.

Versuch 1 wurde zur Einübung des Verfahrens mit natürlicher Äpfelsäure vorgenommen. Das Versuchstier von 2,5 kg Gewicht erhielt 10 g l-Äpfelsäure als Natriumsalz in 30 ccm Wasser unter die Haut gespritzt. Das Tier starb nach 3 Stunden. Der freiwillig entleerte und aus der Blase ausgedrückte Harn belief sich auf 100 ccm. Die Drehung eines Gemisches von 10 ccm Harn, die mit Uranylacetat + Essigsäure auf 15 ccm gebracht waren, erwies sich unter den oben angegebenen Bedingungen = — 7,4%

[1]) E. Biilmann, Ber. 43, 578. 1910.

[2]) Sie war unter diesen Bedingungen ohne Einwirkung auf Äpfelsäure.

im 2-dcm-Rohr. Daraus berechnet sich die Menge der l-Äpfelsäure zu $\frac{15 \cdot 7{,}4 \cdot 1 \cdot 100}{100 \cdot 9{,}78 \cdot 10} = 1{,}135$ g; sie betrug also 11,35% der zugeführten Menge l-Äpfelsäure.

Versuch 2. Einem Kaninchen von 2,2 kg führte ich unter gleichen Bedingungen 10 g d, l-Äpfelsäure als Natriumverbindung zu. Nach 3 Stunden wurden 55 ccm Harn gesammelt. Ein Gemisch von 10 ccm Harn plus Uranylacetat + Essigsäure ad 15 ccm drehte jetzt rechts, und zwar = + 2,30% im 2-dcm-Rohr. Damit findet man die Menge d-Äpfelsäure zu 0,194 g, d. h. zu 1,94% der dargereichten Quantität; die d-Form gelangte also in einem gewissen Überschuß zur Ausscheidung.

Versuch 3. Einem 3 kg schweren Tier wurden 7 g d, l-Äpfelsäure als Natriumsalz in 30 ccm Wasser beigebracht. Das Tier lebte ungefähr 8 Stunden und ließ 85 ccm Harn. Die Drehung belief sich auf + 1,5° im 2-dcm-Rohr, wenn 10 ccm Urin mit dem Uranreagens usw. auf 15 ccm ergänzt waren. Daraus ergibt sich ein Gehalt von 0,195 g d-Äpfelsäure = 2,79% der verabfolgten Menge.

Versuch 4. Ein weiteres Kaninchen, das 2,7 kg schwer war, erhielt wiederum 7 g inaktive Äpfelsäure als Natriumsalz. Harnmenge nach 6 Stunden 62 ccm mit einem Gehalt von 0,105 g = 1,5% der eingespritzten Menge an d-Komponente.

B. Versuch am Hund.

Einem Tier von 7,5 kg Gewicht wurden um 1 Uhr mittags 13 g d, l-Äpfelsäure als Natriumsalz in 60 ccm Wasser subcutan appliziert. Das Tier lebte noch am Abend, wurde aber am folgenden Morgen tot aufgefunden. Die Menge des freiwillig entleerten Urins betrug 370 ccm. Der zuckerfreie und an sich nicht wahrnehmbar drehende Harn wurde durch die Uranbehandlung rechtsdrehend, und zwar zeigten 10 ccm Urin, mit Uranylsalz und Essigsäure auf 15 ccm aufgefüllt, eine Deviation = + 0,50%. Daraus folgt die Menge Äpfelsäure zu 0,283 g oder = 2,18% des verabfolgten Quantums. —

Es ergibt sich somit, daß zwar nach Körpergewicht der Versuchstiere und nach Individualität Unterschiede hinsichtlich der Ausnutzung von d, l-Äpfelsäure bestehen; jedoch glaube ich zusammenfassend aus meinen Versuchen folgern zu können, daß

der Abbau der beiden Raumformen im Falle der Äpfelsäure nicht in gleichem Schritt erfolgt, sondern daß die in der Natur auftretende l-Äpfelsäure etwas leichter angreifbar ist als ihr synthetischer Antipode. Die Erfahrungen über das biologische Verhalten der racemischen Äpfelsäure fügen sich also in dieser Hinsicht den Feststellungen an, die Neuberg und Paul Mayer, Wohlgemuth, Rahel Hirsch sowie Abderhalden und Schittenhelm u. a. gemacht haben und die besagen, daß im allgemeinen die in der Natur vorkommende Komponente im Organismus der höher entwickelten Tiere in größerem Umfange zerstört wird als die ungewohnte Form. Andererseits erfolgt offenbar die Vorbereitung der beiden enantiomorphen Gebilde nicht sehr verschieden, wie dem verhältnismäßig geringem Überwiegen von d-Malat zu entnehmen ist; demnach ist das tierphysiologische Schicksal von d, l-Äpfelsäure ähnlich dem, das Neuberg mit Wohlgemuth und P. Mayer für d, l-Arabonsäure und d, l-Mannonsäure, und Neuberg mit Saneyoshi, Färber und Nord für die Dicarbonsäuren, d-Traubensäure, d, l-Zucker- und d, l-Mannonsäure beobachtet hat.

Biochemische Zeitschrift

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie

Herausgegeben von

F. Hofmeister-Würzburg, C. von Noorden-Frankfurt a. M., E. Salkowski-Berlin, A. von Wassermann-Berlin

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin

Hundertdreiundzwanzigster Band

Fünftes und sechstes Heft

Ausgegeben am 5. November 1921



Berlin

Verlag von Julius Springer

1921

Die **Biochemische Zeitschrift**

erscheint in zwanglosen Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band. **Der Preis** eines jeden Bandes beträgt M. 64.—. Die Biochemische Zeitschrift ist durch jede Buchhandlung sowie durch die unterzeichnete Verlagsbuchhandlung zu beziehen.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als $1^1/_2$ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Mitteilungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens 2 Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Redakteur,

Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hittorfstr. 18,

zu richten.

Die Verfasser erhalten 75 Sonderabdrücke ihrer Abhandlungen kostenfrei, weitere gegen Berechnung. Für den 16 seitigen Druckbogen wird ein Honorar von M. 40.— gezahlt.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer

Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

123. Band. **Inhaltsverzeichnis.** Heft 5/6.

Über Harnsäuresynthese im menschlichen Organismus.

Von

Gustav Kollmann.

(Aus der Chemischen Abteilung des Wiener Physiologischen Universitäts-Institutes und der I. Medizinischen Abteilung der Krankenanstalt Rudolfstiftung in Wien.)

(Eingegangen am 22. Juli 1921.)

I. Das Problem der Harnsäuresynthese.

Im Verlaufe einer Untersuchung, deren Resultate ich kürzlich mitgeteilt habe[1]), war uns bei längerdauernder Ernährung von Menschen mit purinarmer Nahrung die relativ reichliche Harnsäureausscheidung aufgefallen. Die Tagesausscheidung an Harnsäure lag meist zwischen 0,5—1,0 g, trotzdem unserer, wenn auch nur groben, Schätzung nach die mit der Nahrung aufgenommene Purinmenge 0,3—0,5 g kaum überschritten haben dürfte. Diese Wahrnehmung hat uns veranlaßt, der viel diskutierten Frage einer Harnsäuresynthese im Organismus des ausgewachsenen Menschen neuerlich unsere Aufmerksamkeit zuzuwenden.

Wie bekannt, kommt der Hauptanteil des N, der von Säugetieren, Amphibien und Fischen als Harnstoff ausgeschieden wird, bei Vögeln, Reptilien, sowie bei zahlreichen Wirbellosen in Form von Harnsäure zum Vorschein, die zweifellos einer Synthese ihre Entstehung verdankt. Jedoch auch in bezug auf den wachsenden Säugetierorganismus kann es keinem Zweifel unterliegen, daß er Purinkomplexe auf synthetischem Wege neu zu bilden vermag, um mit Hilfe derselben seine Nucleinsäuremoleküle aufzubauen. Dies ist nicht nur für das Ei des Seidenspinners und des Huhns,

[1]) G. Kollmann, Über die Beziehungen der Harnsäureausscheidung zur Durchblutung des Pfortadergebietes. Wien. med. Wochenschr. 1920, Nr. 47.

für den Lachs im Hungerzustand, sondern auch für die purinfrei gefütterte Ratte und für den Säugling erwiesen[1]).

Es hat jedoch nicht an Stimmen gefehlt, die der Meinung Ausdruck gegeben haben, die Fähigkeit, Harnsäure synthetisch neu aufzubauen, sei auch dem Organismus des erwachsenen Säugetieres und Menschen nicht gänzlich abhanden gekommen.

So hat insbesondere H. Wiener[2]) sich dahin ausgesprochen: „Man könnte sich die Vorstellung bilden, daß der Unterschied zwischen dem Stoffwechsel der Vögel und dem der Säugetiere in diesem Punkte kein prinzipieller, sondern nur ein gradueller ist. Bei beiden Tierklassen dürfte die Eiweißzersetzung bis zur Bildung von Harnstoff vor sich gehen, welcher bei Vögeln zum geringsten Teil als solcher ausgeschieden wird, zum größten Teil eine Synthese zur Harnsäure eingeht, während bei Säugetieren der größte Teil unverändert zur Ausscheidung gelangt und nur ein kleiner Bruchteil zur Harnsäuresynthese verwendet wird. Außerdem entsteht bei beiden Tierklassen Harnsäure durch Oxydation der Xanthinbasen und bildet bei den Vögeln einen kleinen, bei Säugetieren den größten Teil der ausgeschiedenen Harnsäure."

Demgegenüber spricht sich R. Burian[3]), nachdem er sich vergeblich bemüht hatte, eine synthetische Harnsäurebildung in Rinderleberauszügen neben der oxydativen festzustellen, dahin aus, es entfalle hiermit die einzige experimentelle Begründung, die für die Annahme einer partiellen synthetischen Entstehung der Säugetierharnsäure bisher beigebracht worden sei. Recht skeptisch lautet auch das Urteil von W. Pfeiffer[4]) nach Nachprüfung der einschlägigen Versuche Wieners. „Durch obige Versuche", sagt Pfeiffer, „ist es noch unwahrscheinlicher geworden als es ohnehin war, daß die pathologische Harnsäureanhäufung bei gewissen Krankheitszuständen von einer vermehrten synthetischen Bildung abhängig sei."

Fürth[5]) resumierte seinerzeit den Stand der Frage dahin: „Für die Annahme einer synthetischen Harnsäurebildung beim Säugetier und Menschen, welche neben der oxydativen einhergehe und dem Vorgange im Vogelorganismus analog verlaufen sollte, liegt vorderhand gar kein Anhaltspunkt vor."

Hammarsten[6]) wollte die Möglichkeit einer Harnsäuresynthese beim Säugetier nicht in Abrede stellen, wenn man auch nicht wisse, inwieweit eine solche tatsächlich vorkommt.

[1]) Vgl. die einschlägige Literatur bei O. Fürth, Probleme der physiologischen und pathologischen Chemie. Bd. II, S. 155. 1913.

[2]) H. Wiener, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **2**, 79. 1902.

[3]) R. Burian, Zeitschr. f. physiol. Chem. **43**, 530. 1904/05.

[4]) W. Pfeiffer, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **10**, 324. 1907.

[5]) l. c. S. 155.

[6]) Hammarsten, Lehrbuch der physiologischen Chemie, 8. Aufl., S. 166. 1914.

Schließlich sprach sich Abderhalden[1]) dahin aus, daß man keine eindeutige Beobachtung kennt, die beweisen würde, daß auch der Mensch, die Säugetiere, die Amphibien und Fische aus Eiweißabkömmlingen Purinsubstanzen zu bereiten vermöchten.

Da, wie erwähnt, eigene Beobachtungen mir den Gedanken an eine sich im menschlichen Organismus vollziehende synthetische Harnsäurebildung immerhin nahegelegt hatten, habe ich versucht, mir auf möglichst einfachem und direktem Wege über dieses Problem Aufschluß zu verschaffen.

Sollte es gelingen, während einer längeren Versuchsperiode darzutun, daß die Menge ausgeschiedener Purinstoffe diejenige der zugeführten Purinstoffe um ein Wesentliches übertreffe, ohne daß die Versuchsperson an Gewicht abgenommen hatte, so müßte dies sehr im Sinne einer Harnsäuresynthese sprechen; denn die Gewichtskonstanz würde in einem solchen Falle jene Ausflucht hinfällig machen, mit der sich die Mehrzahl der Beobachter bei derartigen Versuchen beruhigt haben: indem sie meinten, das Plus an Harnsäure stamme aus zerfallenen Körperzellen.

II. Literaturangaben über Harnsäureausscheidung bei purinarmer Ernährung.

Bevor ich an die Wiedergabe meiner eigenen Versuche gehe, möchte ich die für unsere Fragestellung in Betracht kommenden Literaturangaben kurz resumieren.

Trotz der ungeheuren, kaum übersehbaren Literatur des Purinstoffwechsels vermochte ich nur wenige Arbeiten ausfindig zu machen, die für unser Problem sich unmittelbar verwendbar erwiesen. Vor allem war dies deshalb der Fall, weil nur längerdauernde Versuche mit purinfreier Ernährung und positiver Stoffwechselbilanz für uns in Betracht kommen. Weitaus die meisten Stoffwechselversuche waren von anderen Gesichtspunkten aus unternommen und für uns nicht ohne weiteres verwertbar. Auch die Hoffnung, die umfangreiche Literatur über den Stoffwechsel der Vegetarianer unseren Zwecken dienstbar zu machen, hat sich nur zum geringsten Teil erfüllt. Abgesehen davon, daß durchaus nicht alle Vegetarianer sich purinarm ernähren, wird vielfach, insbesondere bei den Japanern, das Versuchsbild durch

[1]) Abderhalden, Lehrbuch der physiologischen Chemie, Bd. I, S. 587. 1914.

reichlichen Teegenuß gestört. Wenn auch der Übergang[1]) der methylierten Xanthine in Harnsäure nicht gerade wahrscheinlich ist, mußten dieselben doch in unserem Falle als unerwünschte Beigabe erscheinen.

Nach Scheubes[2]) umfangreichen Beobachtungen beträgt die mittlere tägliche Harnsäureausscheidung der Japaner 0,46 g, steht also der des Europäers nicht viel nach[3]). In der militärischen Akademie zu Tokio wird jedem Studenten in der Nahrung pro Tag ca. 83 g Eiweiß gegeben. Von 83 g Eiweiß wird mehr als die Hälfte in Form von Reis geliefert, der als außerordentlich purinarm gelten kann. So bleiben, wenn alles übrige Eiweiß als animalisches geliefert würde, 35 g animalisches Eiweiß, was etwa 140 g Fleisch und nur 0,16 g Harnsäure entspricht. Der Wert dieser Beobachtungen wird allerdings durch den reichlich aufgenommenen Tee beeinträchtigt.

Hirschfeld[4]) nahm in 2 Versuchen, die je 8 Tage dauerten, eine Nahrung zu sich, die nur aus Semmeln, Kartoffeln, Butter, Zucker, Kaffee, Reis, Speck, Kognak und Wein bestand, also außer den im Kaffee enthaltenen Methylpurinen praktisch purinfrei war. Während der ersten 8tägigen Periode schied er 22 g N durch Urin und Faeces mehr aus als er aufgenommen hatte. 22 g N entsprechen ca. 140 g Eiweiß und dieses wieder etwa 650 g Muskelfleisch, wenn man annehmen wollte, daß der Eiweißverlust im wesentlichen auf Kosten von Muskeln gegangen wäre. Die Körpergewichtsabnahme betrug im ganzen Zeitraume 1050 g. Die Gesamtsumme der in 8 Tagen ausgeschiedenen Harnsäure betrug 3,338 g; nun kann der Puringehalt von Fleisch mit rund 0,1% veranschlagt werden[5]). Es müßten also rund 3 kg Muskelfleisch umgesetzt werden, um eine Menge von Purinstoffen in Freiheit zu setzen, die etwa 3 g Harnsäure entspricht. Tatsächlich konnten nach der N-Bilanz nur 650 g umgesetzt worden sein. Eine analoge Umrechnung ergibt für die zweite 8tägige Versuchsperiode eine Ausscheidung von 3,6 g Harnsäure, wobei dem berechneten Umsatz von über 3 kg Muskelfleisch nur ein Gewichtsverlust von 400 g gegenübersteht.

Schreiber und Waldvogel[6]) ernährten einen Mann 8 Wochen lang bloß mit „Eierspeisen" und „vegetabilischer Kost" und stellten während

---

[1]) Bezüglich des Überganges von Coffein und Theobromin in Harnsäure vgl. Noorden, Ernährungslehre, Bd. II, S. 681. 1920. Nach Kaffee- und Teegenuß haben Fauvel, Burian und Schur, Krüger und Schmid und O. Minkowski deutlichen Anstieg der Harnpurinbasen gefunden, dagegen einen Einfluß auf die Harnsäureausscheidung vermißt. Demgegenüber hat A. Besser doch einen beachtenswerten Anstieg der Harnsäure gefunden.

[2]) Scheube, Arch. f. Hyg. **1**, 352. 1883.

[3]) Nakahama, Arch. f. Hyg. **8**, 78. 1888.

[4]) Hirschfeld, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **114**, 301. 1888.

[5]) Schmid und Bessau, Therap. Monatshefte 1910, S. 116.

[6]) Schreiber und Waldvogel, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **42**, 76. 1899.

dieser Zeit allerhand Versuche an. Unter Hinweglassung der durch Eingriffe geänderten Zahlen ergibt sich als Mittelwert 0,435 g Harnsäure pro Tag. Leider sind die Kostangaben ungenau.

Wertvoll sind die sorgfältigen Selbstversuche von Burian und Schur[1]) zur Bestimmung ihres endogenen Harnsäurewertes. Um so mehr, als hier das erste Mal auch die Methylpurine gänzlich ausgeschaltet waren. Leider fehlen genaue Gewichtsangaben. Im großen ganzen befand sich jedoch Burian, an dem der Versuch gemacht wurde, im N-Gleichgewicht. So wurde z. B. in der dritten Versuchsperiode bei annäherndem N-Gleichgewicht und bei einer Nahrung von 500 ccm Milch, 4 Eiern, 300 g Brot, 100 g Reis, 200 g Butter und 35 g Zucker täglich mehr als $^1/_2$ g Harnsäure ausgeschieden. Auch hier müßte, wenn man aus der Harnsäurenausscheidung seinen Rückschluß auf den Zerfall von Körpereiweiß ziehe wollte, dieser ein ganz gewaltiger gewesen sein. Betrug doch die Gesamtharnsäure in 12 purinfreien Tagen 6,7 g, was einem Fleischumsatz von rund 6 kg entsprechen würde.

Erwähnung verdient auch ein 20tägiger Versuch von Fauvel[2]): Er findet bei einem „régime strictement végetal et sans purines“ als durchschnittliche Harnsäureausscheidung pro Tag 0,38 g. Das ist in 20 Tagen 7,6 g, was wiederum, wenn die Purine wirklich aus umgesetzten Körperzellen entstammen würden, einen Körperumsatz von rund 7 kg Muskelfleisch bedeuten würde. Leider liegt keine Gewichtsangabe vor. Doch müßte bei einer Abnutzung, die 7 kg Muskelfleisch aufzehrt, die Körpergewichtsabnahme wohl sicherlich etwa 10 kg betragen (Fetteinschmelzung). Fauvel hätte das bei dem 66 kg schweren Individuum sicher erwähnenswert gefunden. Auch erwähnt er, daß dasselbe Individuum im Anschluß an den Versuch 65 km Radfahren im Tage ohne Ermüdung vertragen hat.

Interessant ist auch eine Angabe Umbers[3]): „Eine Gichtkranke, bei der ich seit $2^1/_2$ Jahren völlig purinfreie Ernährung durchgeführt und die dadurch erhebliche Besserung ihrer seit 15 Jahren progressiv verlaufenden, erblichen Gicht erfuhr, schied in der ersten Zeit der purinfreien Ernährung 0,162 g Purin-N im Durchschnitt aus, bei 9,38 g Gesamt-N, nach 2monatiger purinfreier Ernährung 0,146 g Purin-N bei 8,61 g Gesamt-N (Durchschnitt von 5 Tagen), nach $1^1/_2$ Jahren purinfreier Ernährung 0,122 g Purin-N bei 7,88 g Gesamt-N (6tägiger Durchschnitt) bei einer calorisch ausreichenden Nahrung.“ Es liegt ja auf der Hand, daß eine derartige „purinfreie“ Ernährung nicht wirklich als purinfrei gewertet werden kann, worauf wir später noch zurückkommen werden und daß auch bei einer solchen sicherlich nicht zu vernachlässigende Mengen von Purin mit der Nahrung aufgenommen worden sind; doch dürften sich dieselben innerhalb nicht allzuweiter Grenzen bewegt haben. Daß der Versuch bei einer Gichtikerin vorgenommen wurde, daß auch Angaben über das Körper-

---

[1]) Burian und Schur, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **80**, 241. 1900

[2]) P. Fauvel, Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences **142**, 1292. 1906.

[3]) Umber, Therapie der Gegenwart, 1909, S. 75.

gewicht fehlen, ist in diesem Falle wohl ziemlich belanglos. Denn in dem langen Zeitraum von $2^1/_2$ Jahren hätte, wenn eine Synthese von Purin ganz ausgeschlossen wäre, die Frau grober Schätzung nach wohl mitsamt einem stattlichen in ihren etwaigen Tophi aufgestapelten Harnsäurevorrat vom Erdboden verschwinden müssen.

Die Heranziehung von Hungerversuchen und Versuchen unter zweifellos pathologischen Verhältnissen habe ich vermieden, da ja bei solchen eine umfangreiche Einschmelzung von Körpergewebe tatsächlich nicht ausgeschlossen werden kann.

Immerhin konnte aus den angeführten Beispielen, die sich ja gewiß durch weitere ähnliche leicht vermehren ließen, so viel ersehen werden, daß die Harnsäureausscheidung bei längerdauernder purinfreier Kost und erhaltenem N-Gleichgewicht nicht aufhört oder auch nur merklich absinkt. Da aber die angeführten Versuche mehr oder minder von anderen Gesichtspunkten und aus anderen Gründen unternommen worden waren, da entweder die Versuchsdauer zu kurz oder das N-Gleichgewicht nicht einwandfrei erhalten oder auch die immerhin nicht ganz unverdächtigen Methylpurine nicht ausgeschaltet waren oder aber genaue Kostangaben mangelten oder aber endlich nicht völlig physiologische Verhältnisse vorlagen, hielt ich es für eine nicht undankbare Aufgabe, einen Versuch von langer Dauer durchzuführen, bei dem derartige Fehlerquellen nach Tunlichkeit vermieden werden sollten.

III. Eigene Versuche.

Als Versuchsobjekt diente mir ein 26jähriges, bis auf eine alte Lungenspitzennarbe völlig gesundes Mädchen von blühendem Aussehen, von 150 cm Körperlänge und 56,2 kg Anfangsgewicht.

Ich stellte bei einer durch 7 Wochen durchgeführten praktisch purinfreien Ernährung die tägliche Harnsäureausscheidung fest.

Die Kost bestand aus 5 Eiern, 70 g Butter, 600 ccm Milch, 300 g weiches Biskuit, 150 g Apfelmus, 300 g Grießmilchspeise und 350 g Weißbrot. Grüne Gemüse, Kaffee, Tee, Kakao, Schokolade und Suppe waren vollkommen ausgeschaltet. Die Patientin war eine verläßliche und einsichtige Person, die überdies beständig kontrolliert und durch Stichproben immer wieder überwacht wurde und bei der unerlaubte Nahrungsaufnahme, soweit dies überhaupt praktisch möglich ist, ausgeschlossen erschien.

Der Energiegehalt der Nahrung betrug ca. 2900 Calorien.

Nach den Analysen von Schmid und Bessau wäre der Puringehalt der Nahrung mit Null zu bewerten.

Nach den Analysen von Fellenberg[1]) wäre derselbe ungefähr mit 0,1 g zu berechnen:

350 g Weißbrot			
300 g Biskuit	= 445 g Weißmehl	= 0,061 g	Purin
	5 Eier	= 0,020 „	„
	600 ccm Milch	= 0,018 „	„
	Summe	= 0,099 g	Purin

Der Vergleich der Tabellen von Schmid und Bessau mit denen von Fellenberg ergibt für letztere auffallend hohe Werte. Fellenberg hatte nach durchgeführter Hydrolyse die Kupfer-Bisulfitfällung ausgeführt, den Niederschlag mit H_2S zersetzt und die Cu-Fällung noch einmal wiederholt. Dagegen haben Burian und Schur und andere Autoren bei derartigen Untersuchungen in der Regel zuerst mit $CuSO_4$ und $NaHSO_3$ gefällt, den Niederschlag zerlegt und die zweite Fällung nach dem Vorgang von Krüger und Schmid sowie von Salkowski mit ammoniakalischer Silberlösung resp. mit Silber-Magnesialösung vorgenommen, so insbesondere auch Abderhalden und seine Mitarbeiter.

Wir haben selbst in folgender Art Stichproben vorgenommen:

500 g Weißbrot o. dgl. wurden mehrere Stunden lang mit 2 l 0,5% H_2SO_4 lebhaft gekocht, das Ungelöste abfiltriert, das Filtrat mit NaOH neutralisiert, der Neutralisationsniederschlag abfiltriert, das neutrale Filtrat eingeengt, mit Essigsäure schwach angesäuert und mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit in üblicher Weise gefällt, der Niederschlag filtriert, in heißem Wasser suspendiert und unter wiederholtem Verreiben in der Reibschale tagelang mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Dann wurde der Niederschlag abfiltriert, das Filtrat bis zum völligen Entweichen von Schwefelwasserstoff gekocht und nun mit ammoniakalischer Silberlösung resp. Silber-Magnesiumlösung gefällt. Der Niederschlag wurde auf ein kleines aschefreies Filter gebracht, gut gewaschen und, um Ammoniak zu vertreiben, mit MgO gekocht und schließlich kjehldalisiert.

Es ergaben sich schließlich:

für Weißbrot	0,0024%	Purin-N,	was	ca.	0,007%	Purin	entspricht,
für Mehl	0,0048 „	„	„	„	0,014 „	„	„
für Reis	0,0046 „	„	„	„	0,014 „	„	„

[1]) O. Fellenberg, diese Zeitschr. 88. 1918.

Fellenberg hat für Weißmehl dieselbe Zahl gefunden, für Reis dagegen 0,039%, also fast den dreifachen Wert.

Auch **Burian** und **Schur** haben im Weißbrot nur minimale Spuren von Purinen nachweisen können. Auch wenn wir die hohen Zahlen **Fellenbergs** für Mehl, Milch und Eier zugrundelegen, so würde sich für unsere Kost nicht mehr wie höchstens 0,10 g Purin ergeben.

Die Harnsäurebestimmungen wurden nach der kolorimetrischen Methode von **Benedict** und **Hitchcock**[1]) vorgenommen.

Tabelle I.

	Urinmenge ccm	Harnsäure g		Urinmenge ccm	Harnsäure g
1. Tag	700	0,36	27. Tag	1800	0,45
2. „	1000	0,4	28. „	1700	0,5
3. „	1400	0,34	29. „	1000	0,44
4. „	1500	0,34	30. „	1900	0,5
5. „	1400	0,5	31. „	1900	0,4
6. „	1000	0,36	32. „	1200	0,43
7. „	900	0,3	33. „	1100	0,39
8. „	1000	0,32	34. „	1800	0,47
9. „	1200	0,42	35. „	1200	0,42
10. „	1400	0,46	36. „	1500	0,42
11. „	1300	0,39	37. „	1000	0,4
12. „	1000	0,45	38. „	900	0,37
13. „	1200	0,51			
14. „	1500	0,5	39. „	1300	0,44
15. „	1300	0,5	40. „	1100	0,4
16. „	1200	0,44	41. „	1700	0,43
17. „			42. „	1500	0,48
18. „	Menses.		43. „	1400	0,41
19. „			44. „	1200	0,4
20. „	1200	0,4	45. „		
21. „	1400	0,46	46. „	Menses.	
22. „	1500	0,38	47. „		
23. „	1800	0,37	48. „		
24. „	1900	0,39	49. „	1100	0,42
25. „	1700	0,32	50. „	1000	0,46
26. „	1500	0,38	51. „	1600	0,45

Am Ende des Versuches wog das Mädchen 60,1 kg, hatte also 3,9 kg angesetzt, das Aussehen war ein sehr gutes. Die Gesamtharnsäureausscheidung der Versuchszeit, mit Weglassung

[1]) **Benedict** and **Hitchcock**, Journ. of biol. chem. **20**, 619. 1915.

der Menstruationszeit, betrug 18,37 g. Die mittlere Tagesausscheidung an Harnsäure betrug also in diesem Falle 0,42 g. Selbst unter Annahme der hohen Zahlen Fellenbergs würde sich also ein tägliches Plus von ca. 0,3 g ergeben, was für die 50tägige Versuchsperiode 15 g mehr ausgeschiedene Purinsubstanz bedeutet.

Selbst wenn man, was offenbar zu hoch gerechnet ist, etwa den Puringehalt der Muskelsubstanz, die ja die Hauptmenge des lebenden Körperprotoplasmas ausmacht, mit 0,2% Purin in Rechnung bringt, so hätte die Versuchsperson 7,5 kg an Muskelsubstanz abbauen müssen. Es liegt wohl auf der Hand, daß dies nicht ohne einen zumindest ebenso großen Gewichtsverlust hätte geschehen können. Tatsächlich ist aber von einem Gewichtsverlust keine Rede. Vielmehr ist eine erhebliche Gewichtszunahme zu verzeichnen.

Dieser Versuch zusammen mit dem im vorausgehenden Kapitel angeführten Versuchsmaterial anderer Beobachter spricht sehr zugunsten der Annahme, daß tatsächlich eine synthetische Neubildung von Purinsubstanz im Organismus stattgefunden hat.

Wenn wir nicht ohne weiteres den Schluß ziehen, daß dies tatsächlich der Fall ist, so geschieht es aus dem Grunde, weil das in bezug auf den Puringehalt von Nahrungsmitteln vorliegende Beobachtungsmaterial in Wirklichkeit ein dürftiges ist. Abgesehen von den Standardanalysen von Burian und Schur und den unter Burians Aufsicht ausgeführten Analysen von Hall[1]) liegen tatsächlich unseres Wissens systematische Untersuchungen nur von Schmid und Bessau und von Fellenberg vor, außerdem eine Anzahl einzelner Befunde, wie insbesondere die Analyse der Kartoffeln von Abderhalden und seinen Mitarbeitern[2]). Alle diese Befunde weichen erheblich voneinander ab.

Wir halten es daher, bevor wir aus unseren Befunden weitgehende physiologische Schlüsse ziehen, für geboten, dieselben auf eine festere Basis zu stellen und uns durch neuerliche systematische Untersuchungen, über die wir bei späterer Gelegenheit zu berichten gedenken, die Gewißheit zu verschaffen,

[1]) J. W. Hall, Inaug.-Diss. Manchester 1902; Chem. Zentralblatt **1**, 1169. 1902.

[2]) Abderhalden, Ewald, Fodor und Röse, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **160**, 513. 1915.

ob die bisher angewendeten Methoden der Purinbasenbestimmung in den Nahrungsmitteln wirklich annähernd richtige Vorstellungen über den wahren Puringehalt derselben geben und ob derselbe nicht etwa bisher unterschätzt worden ist.

Zum Schlusse sei es mir gestattet, meinem verehrten Chef, dem Vorstande der I. Medizinischen Abteilung der Krankenanstalt Rudolfstiftung in Wien, Herrn Professor Dr. Gustav Singer, für die gütige Erlaubnis zur Ausführung des Versuches meinen besten Dank auszusprechen.

Zusammenfassung.

Das in der Literatur vorliegende Material, insbesondere Beobachtungen von Hirschfeld, Schreiber und Waldvogel, Burian und Schur, Fauvel und Umber legen den Gedanken an die Möglichkeit einer synthetischen Harnsäurebildung auch im Organismus des erwachsenen Menschen nahe. Bei einer 50tägigen Beobachtung an einem 26jährigen gesunden Mädchen bei konstanter Ernährung mit sehr purinarmer Nahrung wurde bei Zunahme von fast 4 kg Körpergewicht eine Mehrausscheidung von 15 g Harnsäure über das mit der Nahrung aufgenommene Quantum festgestellt, welche anscheinend nicht durch Abbau von kernhaltigem körpereigenen Zellmaterial ausreichend erklärt werden kann. Weitere methodische Untersuchungen über den tatsächlichen Puringehalt der wichtigsten Nährstoffe sollen Klarheit darüber bringen, ob tatsächlich eine Purinsynthese aus purinfreiem Material im Organismus stattgefunden hat.

Studien über den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf das Wachstum und die Toxinbildung der Tetanusbacillen.

Von

K. G. Dernby und B. Allander.

(Aus dem Bakteriologischen Laboratorium des Schwedischen Staates zu Stockholm.)

(Eingegangen am 25. Juli 1921.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Inhaltsverzeichnis:

I. Einleitung.

Es ist eine altbekannte Tatsache, daß bei der Herstellung von Tetanustoxin bisweilen große praktische Schwierigkeiten zu überwinden sind. Es ist wohlbekannt, daß in diesem Falle zwischen

üppigem Wachstum und starker Toxinproduktion nicht immer Parallelismus besteht. In einer früheren Arbeit hat einer von uns mit H. David zusammen die Bildung von Diphtherietoxin studiert (Dernby und David 1921) und dabei gefunden, daß die Wasserstoffionenkonzentration einer der wichtigsten Faktoren dafür ist. Die Kurve des Wachstums und die der Toxinbildung waren ziemlich parallel. Durch Regulierung der Wasserstoffionenkonzentration des Nährsubstrates, so daß diese für das Wachstum geeignet wird, daß sie nicht sauer wurde, konnte immer gutes Toxin erhalten werden.

In der vorliegenden Arbeit haben wir die Frage aufgenommen, unter welchen Bedingungen die Tetanusbacillen sich am günstigsten entwickeln und das beste Toxin produzieren.

Aber wenn es sich um die Tetanustoxindarstellung handelt, wird das Problem komplizierter. Denn teils entwickeln sich die meisten Tetanusstämme besser unter anaeroben als unter aeroben Bedingungen, während der Diphtheriebacillus ein ausgeprägter Aerobier ist, und teils scheint es, als ob das Tetanustoxin viel leichter zerstört werden kann als das Diphtherietoxin (Reymann 1917, v. Eisler und Pribram).

Über die chemische Natur des Tetanustoxins sind mehrere Arbeiten veröffentlicht worden. Dies ist jedoch eine Frage, auf die wir im folgenden gar nicht eingehen werden. Unser Endzweck ist gewesen, das Wachstum der Tetanusbacillen und die Bildung des Tetanustoxins in bezug auf die Wasserstoffionenkonzentration zu studieren.

Wir müssen einen scharfen Unterschied zwischen Wachstum und Toxinbildung aufstellen, und die beiden Vorgänge jeden für sich studieren.

Wir wollen keineswegs behaupten, daß die Wasserstoffionenkonzentration der einzige Faktor und auch nicht, daß sie der wichtigste Faktor für das Wachstum und die Toxinbildung sein sollte. Man kann eine ganze Reihe von anderen Faktoren aufstellen, wie z. B.:

besondere Eigenschaften der Mikroorganismen,
die Sauerstoffspannung,
die Zusammensetzung der Stickstoffnahrung,
akzessorische Stoffe, wie Zucker, Salze usw.,
„Vitamin“-Substanzen.

Was die besonderen Eigenschaften der Tetanusbacillen anbelangt, so scheint es, als ob diese Mikroorganismen sich als sehr unberechenbar erweisen könnten. Es kann vorkommen, daß ein gewisser Stamm, der lange Zeit gutes Toxin gegeben hat, ganz plötzlich diese Fähigkeit einbüßt. Aber diese Schwierigkeit kann dadurch verringert werden, daß man stets mit einer Mischung verschiedener Stämme aussät.

Früher war man der Ansicht, daß die Tetanusbacillen streng anaerob seien und daß nur in gewissen Fällen, so z. B. durch Symbiose mit B. subtilis oder anderen aeroben Mikroorganismen, Toxin auch durch aerobe Züchtung gelingen könne (Debrand 1903). Aber seitdem Tetanusstämme gefunden sind, die sowohl unter aeroben als anaeroben Bedingungen (siehe Reymann 1917) gutes Toxin abgeben, ist man von dem vollständigen Sauerstoffabschluß nicht mehr ganz abhängig.

Ein wichtiger Faktor ist sicher die Zusammensetzung der Stickstoffnahrung, besonders das Verhältnis zwischen Eiweiß-, Peptid- und Aminostickstoff. Seitdem Kitasato die Tetanusbacillen reingezüchtet hatte, verwendet man nach ihm Rinder- oder Kalbsbouillon. Und es scheint, als ob die Tetanusbacillen in solchen Bouillons gut gedeihen, weshalb auch diese Frage einstweilen nicht zu den brennendsten gehört.

Unter den akzessorischen Nährsubstanzen spielen insbesondere Traubenzucker und andere Zuckerarten eine große Rolle. Schon Kitasato empfahl Zusatz von Zucker bis zu 2%. v. Eisler und Pribram haben sowohl üppiges Wachstum als auch gute Toxinbildung bei Zuckerzusatz beobachtet, doch fehlt es in der Literatur nicht an Angaben, wonach Zucker besonders für die Toxinbildung nicht unbedingt günstig sein soll.

Aber wie bei der Arbeit über Diphtherietoxin (Dernby und David 1921) hängt auch hier die Zuckerfrage eng mit der Wasserstoffionenkonzentrationsfrage zusammen. Es ist wohl nicht so zu verstehen, daß der Zucker an und für sich die Toxinbildung hemmt, vielmehr sind es die bei der Vergärung des Zuckers gebildeten Säuren, die eine Vermehrung der Wasserstoffionen bewirken, welche das Toxin zerstören.

Erwähnt muß auch werden, daß man gefunden zu haben meint (Brieger 1887), daß ein Zusatz von Chlornatrium von 2% einen fördernden Einfluß auf die Toxinbildung haben soll.

Die Diphtheriebacillen wachsen vorzüglich auf autolysierter oder vergorener Bouillon, die Tetanusbacillen dagegen nicht oder nur spärlich. Die meisten Autoren sind darin einig, daß die Tetanusbacillen frisch bereitete Bouillon verlangen und sowohl in alter als auch in zu stark autoclavierter Bouillon schlecht wachsen (siehe v. Eisler und Pribram); doch muß erwähnt sein, daß Erfahrungen in entgegengesetzter Richtung vorliegen. Im modernen Sinne könnte man es so erklären, daß es sich um eine „Vitamin“-Frage handelte. Wie wichtig diese Frage auch ist, so ist sie doch noch so in Dunkel gehüllt, daß wir sie hier im folgenden außer Betracht lassen. In diesem Zusammenhang muß jedoch erwähnt werden, daß manche

Autoren behaupten (Uschinsky, Buchner), bei Anwendung von nur synthetischen Nährsubstraten gutes Tetanuswachstum erhalten zu haben.

Was den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentrationen auf Wachstum und Toxinbildung, studiert mit modernen Methoden, anbelangt, so sind unseres Wissens keine Arbeiten, wenigstens keine veröffentlichten, vorhanden. Über den Einfluß von Säuren und Basen auf das Wachstum und die Toxinbildung liegen jedoch viele ältere Angaben in der Literatur vor. Die allgemeine Schlußfolgerung, die man aus diesen Arbeiten ziehen kann, ist, daß die Tetanusbouillon neutral oder schwach alkalisch sein muß und daß sowohl Säuren als Basen das Wachstum hemmen und das Toxin zerstören. Besonders sollen stärkere Säuren in größeren Konzentrationen das Toxin sehr schnell zerstören.

II. Versuchsmethodik und Bemerkungen.

Um die Darlegungen in den folgenden Abschnitten nicht unnötig zu belasten, werden wir hier einen kurzgefaßten Bericht über die wichtigsten Versuchsmethoden, die wir angewendet haben, einfügen.

a) Die Bakterien.

Wir haben uns nur solcher Tetanusstämme bedient, die sowohl unter aeroben wie anaeroben Bedingungen Toxin liefern. Einer derselben stammt aus dem „Danska Statens Seruminstitut", Kopenhagen, und ist nach Angabe ursprünglich aus Rotterdam gekommen, und wir bezeichnen diesen im folgenden als „Dänischer Stamm". Die anderen sind von Dr. Petrie am Lister Institut, Elstree, England, zur Verfügung gestellt, wofür wir unsere größte Dankbarkeit zum Ausdruck bringen. Diese sind als „Englische Stämme" bezeichnet. Über den ersten Ursprung dieser Kulturen ist uns nichts Näheres bekannt.

Als Ausgangsmaterial für die Aussaat benutzten wir 48stündige Agar- oder Bouillonkulturen.

Überall haben wir uns bei den wissenschaftlichen Experimenten strenger Reinkulturen bedient. Die Kulturen wurden auf ihre Reinheit geprüft.

b) Die Bereitung des Nährsubstrates.

Als Nährsubstrat haben wir gewöhnliche, mit Pepton versetzte Kalbsbouillon angewendet. Wir haben verschiedene Bouillontypen geprüft, aber sind bei folgenden stehen geblieben.

Frisch geschlachtetes feines Kalbfleisch wird in der Hackmaschine zerkleinert. Zu 5 kg Fleisch werden 10 Liter Wasserleitungswasser zugesetzt und die Mischung während der Nacht im Eisschrank stehengelassen. Am nächsten Tage wird die Mischung 1 Stunde lang bei 60° C erwärmt, worauf filtriert wird. Zum Filtrat wird 1,5% Pepton (Witte) und 0,5% Kochsalz zugesetzt. Alsdann wird die Bouillon mit Natriumhydrat oder Natriumcarbonat, im gewöhnlichen Falle braucht man zu 10 Liter etwa 40 g Krystallsoda, neutralisiert und die Alkalinität so bestimmt, daß sie etwa $p_H = 8$ entspricht. Die Bouillon wird 20—30 Minuten gekocht. Hierdurch entsteht eine starke Trübung. Die Alkalinität wird nun in folgender Weise genau justiert. Etwa 50 ccm werden herausgenommen, filtriert und abgekühlt. Die Wasserstoffionenkonzentration wird in gewöhnlicher Weise in 10 ccm Bouillon bestimm (siehe unten) unter Benutzung von Phenolsulphonphthalein als Indikator und Sörenschen Phosphatmischungen als Vergleichsflüssigkeiten. Wenn die Probe nicht $p_H = 8$ zeigt, setzt man soviel $^n/_{10}$-NaOH oder HCl zu, daß $p_H =$, genau $= 8$, wird. Eine einfache Rechnung ergibt nun, wieviel NaOH oder HCl zu der ganzen Bouillonmenge zugesetzt werden muß, um die gewünschte Alkalinität zu erhalten.

Es versteht sich von selbst, daß diese Methode viel genauer ist als die alte, wo man zuerst bis zum Phenolphthaleinumschlag alkalisiert und dann eine mehr oder weniger beliebige Menge Salzsäure zusetzt. Mit der modernen Methode kann man immer eine Bouillon mit genau derselben Wasserstoffionenkonzentration reproduzieren.

Von der Bouillon wurden in große Glasflaschen je 5 l gegossen und in 20 Minuten bei 108—110° C autoklaviert.

Die Bouillon muß 24 Stunden stehen und abkühlen und ist dann fertig zum Gebrauch. Die in solcher Weise bereitete Bouillon wird im folgenden als „ordinäre" Bouillon bezeichnet.

Außer dieser Bouillon haben wir in besonderen Fällen andere Typen gebraucht. Eine derselben nennen wir „autolysierte" Bouillon und diese unterscheidet sich von der vorigen nur dadurch, daß das Kalbfleisch anstatt während der Nacht im Eisschrank zu stehen, im Thermostat bei 37° digeriert wird. Hierbei wird teils der Zucker vergoren, teils findet eine teilweise Autolyse statt, wodurch die Bouillon reicher an Aminostickstoff wird.

Einen dritten Typ bezeichnen wir kurzweg als „Trypsinbouillon", welche zur Hälfte aus dänischer Bouillon besteht, während die andere Hälfte ein Dekokt von mit Trypsin behandeltem Kalbfleisch ist.

Wie schon gesagt, haben wir jedoch vorwiegend die ordinäre Bouillon gebraucht.

Der Gehalt an Stickstoff in verschiedenen Formen kann sehr beträchtlich variieren. Wir haben in verschiedenen Bouillons sowohl den Totalstickstoff (nach Kjeldahl) als auch den Aminostickstoff (Formolmethode Sörensens) bestimmt. Die folgende Zusammenstellung zeigt die Zusammensetzung zweier dieser Bouillons.

	Total-N	Amino-N	Eiweiß-N
A. Ordinäre Bouillon . .	2,1 g/L	15%	+++
B. Trypsinbouillon . . .	2,1 g/L	84%	Spuren

c) Der Einfluß der Sterilisation auf die Wasserstoffionenkonzentration des Nährsubstrates.

Neuerdings ist der Frage, wie die Wasserstoffionenkonzentration eines Mediums sich bei Autoklavierung verändert, große Aufmerksamkeit geschenkt worden. Einige amerikanische Autoren, wie Mudge (1917) und Foster and Randall (1921), haben dieses Problem ausführlich behandelt und haben hervorgehoben, daß das Medium speziell bei Zuckerzusatz nach Sterilisierung saurer war. Da aber die Auffassung dieser Forscher von der Sache einseitig und das Problem von besonderer Wichtigkeit ist, wollen wir es hier näher erörtern.

Selbstredend spielen der Druck und die Temperatur bei der Autoklavierung eine große Rolle. Im folgenden beschränken wir uns nur auf mäßige Temperaturen und Drucke bis zu 120° C und 2 Atm.

Wird das Medium bei Sterilisation saurer oder alkalischer? Diese Frage läßt sich nicht eindeutig beantworten. Sie ist viel zu kompliziert. Wenn wir darüber nachdenken, welche Faktoren hier einspielen können, können wir folgende ausfindig machen.

A. Veränderungen der Eiweißstoffe.

B. Den Zuckergehalt.

C. Das Gleichgewicht Kohlensäure-Bicarbonat-Carbonat.

D. Das Alkali des Glasgefäßes.

Was das letztere betrifft, so ist es wohlbekannt, daß wenn man destilliertes Wasser von neutraler Reaktion in einem Glaskolben kocht, es bald so alkalisch wird, daß es Phenolphthalein färbt, d. h. das Wasser hydrolysiert das Natriumsilicat des Glases. Besonders wenn man neue Glasgefäße anwendet, ist diese Wirkung beträchtlich, aber doch, wenn die Gefäße älter und mehrmals gebraucht worden sind, werden sie resistenzfähiger gegen Wasser. Man könnte daher erwarten, daß aus diesem Grunde die Nähr-

substrate nach Sterilisation alkalischer werden sollten. In der Praxis haben wir jedoch nur gut ausgekochte Flaschen und Retorten angewendet, und da auch die Autoklavierung bei so niedriger Temperatur und in so kurzer Zeit erfolgt ist, können wir demnach diesen Faktor nahezu ganz beiseite lassen.

Was die Veränderungen der Eiweißstoffe durch die Autoklavierung betrifft, so ist die vornehmste, daß besonders in Lösungen alkalischer als $p_H = 7$ eine Ausfällung stattfindet. Hierdurch wird Alkali frei und p_H steigt. Man kann auch denken, daß durch die Autoklavierung gewisse Eiweißstoffe zerfallen. Wie p_H sich dabei verändert, ist unmöglich vorherzusagen. Wie Dernby (1917) gezeigt, hängt dies von den Werten der Dissoziationskonstanten der einzelnen Peptide und Aminosäuren ab. Wenn z. B. Glycylglycin, dessen Dissoziationskonstante $K_a = 3{,}3 \cdot 10^{-10}$ in alkalischer Lösung zu Glykokoll, dessen $K_a = 1{,}05 \cdot 10^{-9}$ ist, gespaltet wird, wird die Reaktion sich sehr beträchtlich in alkalischer Richtung verändern.

Doch wenn man die Sterilisierung bei möglichst niedriger Temperatur während kurzer Zeit vornimmt, spielen die Verwandlungen der Eiweißstoffe nur eine untergeordnete Rolle betreffs der Veränderungen der Wasserstoffionenkonzentration.

Um so wichtiger sind die von vorhandenem Zucker herrührenden p_H-Veränderungen. Aus der Arbeit von Foster und Randall entnehmen wir folgende Zusammenstellung:

	a)	b)	c)	d)	e)	f)	g)
p_H vor Autoklavierung . .	5,8	6,9	6,5	7,1	7,8	8,1	8,6
p_H nach „ . .	5,6	5,9	6,2	6,9	7,3	7,8	8,4

In diesem Fall war das Fleisch etwas zuckerhaltig und kein extra Zucker zugesetzt. Wenn dies der Fall ist, werden die Differenzen noch größer. Durch die Erhitzung wird der Zucker zum Teil gespalten und liefert Säuren, die die Wasserstoffionenkonzentration erhöhen. Wenn daher Zucker im Nährsubstrat vorhanden ist, kann man erwarten, daß p_H sinkt.

Aber auch das Entgegengesetzte kann eintreffen, besonders wenn kein oder nur sehr wenig Zucker vorhanden ist. Dies konnten wir in der erwähnten Arbeit über Diphtherietoxin von Dernby und David (1921) beobachten, wo wir mit autolysierter oder vergorener Bouillon arbeiteten. Folgende Zahlen beweisen dies:

p_H-Veränderungen in autolysierter Bouillon.

	a)	b)	c)
p_H vor Sterilisierung	7,0	7,3	7,6
p_H unmittelbar nach Sterilisierung. . .	7,3	7,6	8,2
p_H 48 Stunden nach Sterilisierung . .	7,0	7,3	7,7

Hier haben wir also eine beträchtliche Erhöhung in p_H unmittelbar nach der Autoklavierung, aber wenn die Kolben einige Tage bei Zimmertemperatur stehen bleiben, dann sinkt p_H wieder und die ursprünglichen Werte werden erreicht.

Die Erklärung hierfür ist wohl, daß bei Zimmertemperatur ein gewisses Gleichgewicht zwischen freier Kohlensäure, Bicarbonationen und Carbonationen besteht, woraus ein bestimmtes p_H resultiert. Bei der kräftigen Temperatursteigerung während der Sterilisierung wird dieses Gleichgewicht verschoben, Kohlensäure entweicht und die Reaktion wird daher alkalischer. Aber wenn die Flüssigkeit bei Zimmertemperatur steht, absorbiert sie allmählich Kohlensäure aus der Luft und das alte Gleichgewicht wird wieder erreicht.

Man sieht jedoch gleich, daß man in solchen speziellen Fällen das Nährsubstrat nicht gleich nach der Sterilisierung anwenden kann, weil p_H zu hoch geworden ist. Es ist am sichersten, es erst zu inokulieren, nachdem es einige Tage gestanden hat.

Aus obigem geht hervor, daß p_H nach Autoklavierung sowohl größer als kleiner sein kann. Mitunter ist es unmöglich vorauszusagen, welches der Fall sein wird. Es ist daher notwendig, die Wasserstoffionenkonzentration nicht nur vor der Sterilisation, sondern auch nach derselben genau zu justieren. Sollten die Veränderungen zu groß werden, so kann man diese Justierung durch Zusatz von etwas steriler Salzsäure bzw. Natronlauge ausführen.

d) Bestimmung des Wachstums der Tetanusbacillen.

Von der oben erwähnten ordinären Bouillon, mit der Modifikation, daß sie schwach autolysiert war, um den Zuckergehalt niederzubringen, wurden neun verschiedene Sätze gemacht, bei denen verschiedene Mengen Salzsäure oder Natronlauge zugesetzt wurden, um die gewünschte Wasserstoffionenkonzentration zu erreichen. In Tabelle I ist eine solche Präparation angegeben.

Wenn man Alkali hinzufügt und autoklaviert, entsteht eine Trübung. Wir haben diese in der Weise beseitigt, daß wir eine

doppelte Sterilisation vorgenommen haben. Das erstemal bei ca. 112°, dann filtriert, und eine zweite Sterilisierung bei etwa 105°. In gewöhnliche sterile Reagensgläser wurden je 20 ccm Bouillon eingefüllt. Wir erhielten so eine Anzahl Sätze in neun Reagensgläsern, alle neun mit verschiedenem p_H, und in allen war die Flüssigkeit ganz hell und durchsichtig.

Tabelle I.

Zusammensetzung der Standardbouillonmischungen.

10 ccm Bouillon + N-NaOH oder HCl + Wasser = 11 ccm. Schwach autolysierte Bouillon.

Nr.	ccm n-NaOH	ccm n-HCl	ccm H_2O	p_H elektrometrisch gemessen
1	—	0,60	0,40	3,67
2	—	0,15	0,85	4,81
3	—	—	1,00	5,70
4	0,05	—	0,95	6,35
5	0,12	—	0,88	7,04
6	0,20	—	0,80	7,44
7	0,25	—	0,75	7,82
8	0,40	—	0,60	8,33
9	0,80	—	0,20	8,70

Selbstredend kann die Tabelle I nur als ein Beispiel angesehen werden, denn bei jeder neuen Stammbouillon muß man die Mengen von Salzsäure und Natronlauge wieder von neuem bestimmen.

Das Wachstum der Tetanusbacillen wurde durch vergleichende Abschätzung der Trübung festgestellt. Anstatt der gewöhnlichen Zeichen +, ++ usw. haben wir Zahlen benutzt, welche folgende Bedeutung haben:

0. kein Wachstum,
1. beginnendes Wachstum,
2. spärliches Wachstum,
3. gutes Wachstum,
4. üppiges Wachstum.

Allerdings ist die Methode subjektiv, aber man erhält doch gute Vergleichsresultate. Sowohl die Grenzen wie das Optimum des Wachstums können sehr scharf beobachtet werden. Man erhält eine sehr deutliche „Wachstumskurve“, die graphisch reproduziert werden kann, wie dies einer von uns demonstriert hat (Dernby, 1921).

e) Die Toxinprüfungen.

Die Toxinprüfungen wurden in gewöhnlicher Weise ausgeführt. Als Versuchstiere wurden weiße Mäuse von ca. 15 g Gewicht angewendet und mit $^1/_{100}$, $^1/_{1000}$, $^1/_{10\,000}$ ccm usw. subcutan inokuliert. Wenn eine Maus mit $^1/_{100}$ ccm eingespritzt, keine Zeichen von Tetanus zeigte, haben wir das Agens mit 0 Toxin bezeichnet.

f) Bestimmungen der Wasserstoffionenkonzentration.

Wir haben der Hauptsache nach die colorimetrische Methode von Sörensen angewendet, um die Wasserstoffionenkonzentration zu bestimmen. Doch haben wir als Indicatoren diejenigen von Clark und Lubs hergestellt. Hier ist es unmöglich auf Einzelheiten einzugehen, wir verweisen vielmehr auf die ausgezeichnete Originalarbeit der genannten Forscher (siehe Clark und Lubs, 1917), die Originalarbeit von Sörensen (Enzymstudien II, 1909), Michaelis' Monographie „Die Wasserstoffionenkonzentration", 1914) und die Monographie von Clark (1920).

Die Indikatoren waren folgende und haben einen sehr kleinen sog. „Eiweißfehler":

	p_H-Grenzen
Thymolblau	1,2–2,8
Brom-Phenolblau	2,8–4,6
Methylrot	4,4–6,6
Propylrot	4,8–6,4
Brom-Cresolpurpur	5,2–6,8
Brom-Thymolblau	6,0–7,6
Phenolrot	6,8–8,4
Cresolrot	7,2–8,8
Cresolphthalein	8,2–9,8

Die Standardlösungen waren die von Sörensen vorgeschlagenen:

1. HCl	$^1/_{10}$ Mol
2. Natriumcitrat	$^1/_{10}$ „
3. KH_2PO_4	$^1/_{15}$ „
4. $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$	$^1/_{15}$ „
5. Natriumborat	$^1/_{10}$ „
6. NaOH	$^1/_{10}$ „

Um p_H elektrometrisch zu bestimmen, bedienten wir uns einer genauen Kopie des Michaelisschen Apparats mit den von ihm angegebenen Elektroden. Für die Bestimmungen von p_H in den Tetanuskulturen haben wir nur selten die elektrometrische Methode benutzt, unseres Erachtens ist innerhalb des Gebietes $p_H = 6$ bis $p_H = 8$ (Neutralzone) die colorimetrische Methode mit den Clarkschen Indicatoren besser geeignet, um schnelle

und zuverlässige Resultate zu erhalten, wenn es sich um Bouillonkulturen handelt. Die elektrometrische Methode hat uns gedient, um die Standardlösungen genau zu bestimmen. Man kann sicher sein, daß Differenzen von 0,1 in p_H sehr deutlich wahrgenommen werden können.

In sämtlichen Fällen, wo p_H in den Kulturen bestimmt werden soll, sind diese entweder gefärbt oder trübe oder beides zugleich. Aber wenn die Farbe oder Trübung nicht zu stark ist, kann dieser Umstand leicht eliminiert werden durch Anwendung eines „Komparators" nach dem Walpoleschen Prinzip. Sind die Lösungen sehr gefärbt oder trübe, so können sie mit destilliertem Wasser bis auf das 3- oder 4fache ihres Volumens verdünnt werden, ohne daß p_H sich beträchtlich verändert (siehe Clark und Lubs).

Abb. 1a gibt Walpoles Schema wieder und Abb. 1b einen Komparator, den wir mit sehr gutem Erfolg angewendet haben und bei dem reflektiertes anstatt durchfallendes Licht gebraucht wird.

Man muß bei der Ausführung von colorimetrischen p_H-Bestimmungen stets daran denken, daß diese immer bei derselben

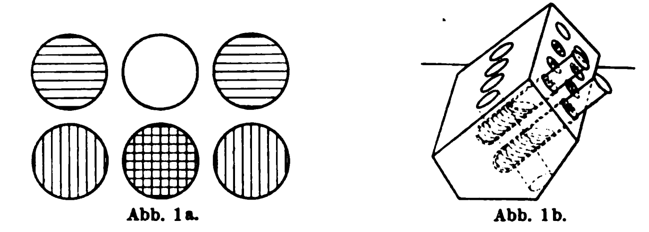


Abb. 1a. Abb. 1b.

Temperatur, Zimmertemperatur, vorgenommen werden sollen. Hat man z. B. eine Flüssigkeit, die bei 20° mit Phenolsulphonphthalein $p_H = 7,2$ angibt und erwärmt dieselbe auf 50°, so wird die Indicatorfarbe ein p_H von etwa 7,6 angeben. Dies bedeutet nicht, daß p_H tatsächlich 7,6 ist, sondern daß die Dissoziationskonstante des Indicators sich mit der Temperatur so verändert hat, daß sie einen solchen Wert angibt. Man muß daher, bevor man die Prüfung vornimmt, die Flüssigkeiten stets vorerst auf Zimmertemperatur abkühlen.

III. Das Wachstum der Tetanusbacillen in seiner Beziehung zur Wasserstoffionenkonzentration.

a) Das Wachstum der Tetanusbacillen bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration.

Die Frage, die zunächst zu studieren ist, ist die Beziehung zwischen Wachstum und Wasserstoffionenkonzentration. Wie gesagt, haben frühere Autoren geäußert, daß zwischen Wachstum

und Toxinproduktion kein bestimmtes Verhältnis besteht. Es scheint im allgemeinen, als hätte man gefunden, daß es leichter ist, gutes Wachstum zu erhalten als gutes Toxin. Weiter hat man gefunden, daß sowohl Säuren als Basen auf das Wachstum einwirken. Die Tetanusbacillen scheinen am besten in neutraler oder schwach alkalischer Reaktion zu gedeihen.

Mit Benutzung der in der Abteilung „Methodik" angegebenen Methode haben wir hier die p_H-Grenzen und das p_H-Optimum für das Wachstum verschiedener Stämme von Tetanusbacillen untersucht. Die Züchtung ist sowohl unter aeroben wie anaeroben Bedingungen ausgeführt worden. In allen Fällen wurde ordinäre, schwach autolysierte Stammbouillon angewendet. Übrigens sprechen die Tabellen II, III und IV, in denen die Resultate einiger solcher Versuche veranschaulicht werden, für sich selbst.

Tabelle II.

Optimales Wachstum der dänischen Bacillen.

Aerobe Züchtung. Schwach autolysierte Bouillon. Temp. 37°.

Nr.	p_H		Wachstumsgrad nach			
	Im Anfang	Nach 5 Tagen	18 Stunden	2 Tage	3 Tage	5 Tage
1	3,7	3,7	0	0	0	0
2	4,8	4,8	0	0	1	1
3	5,4	5,4	0	1	2	2
4	6,3	6,2	0	1	3	3
5	7,0	7,0	2	3	4	4
6	7,4	7,2	3	4	4	4
7	7,8	7,6	1	3	4	4
8	8,3	8,0	0	2	4	4
9	8,6	8,6	0	0	0	0

Tabelle III.

Optimales Wachstum der dänischen Bacillen.

Anaerobe Züchtung. Schwach autolysierte Bouillon. Temp. 37°.

Nr.	p_H		Wachstumsgrad nach			
	Im Anfang	Nach 5 Tagen	18 Stunden	2 Tage	3 Tage	5 Tage
1	3,7	3,7	0	0	0	0
2	4,8	4,8	0	0	0	0
3	5,4	5,4	0	0	2	3
4	6,3	6,3	0	1	2	3
5	7,0	7,0	2	2	3	4
6	7,4	7,3	3	4	4	4
7	7,8	7,6	3	4	4	4
8	8,3	8,1	2	3	3	3
9	8,7	8,7	0	0	0	0

Tabelle IV.

Optimales Wachstum der englischen Bacillen.

Aerobe Züchtung. Schwach autolysierte Bouillon. Temp. 37°.

Nr.	p_H Im Anfang	p_H Nach 8 Tagen	Wachstumsgrad nach 24 Stunden	48 Stunden	4 Tage	6 Tage
1	3,6	3,6	0	0	0	0
2	4,8	4,8	0	0	1	1
3	5,7	5,6	1	2	3	4
4	6,4	6,4	2	3	4	4
5	7,0	7,0	3	4	4	4
6	7,4	7,2	3	4	4	4
7	7,8	7,6	$2^1/_2$	4	4	4
8	8,3	8,0	0	1	4	4
9	8,7	8,7	0	0	0	0

Die Ziffern von Tabelle IV haben wir benutzt, um eine graphische Darstellung von der Beziehung zwischen Wachstum und Wasserstoffionenkonzentration zu demonstrieren, und diese Darstellung liegt in Abb. 2 vor. Als Abszisse ist p_H gewählt, als Ordinate der Wachstumsgrad.

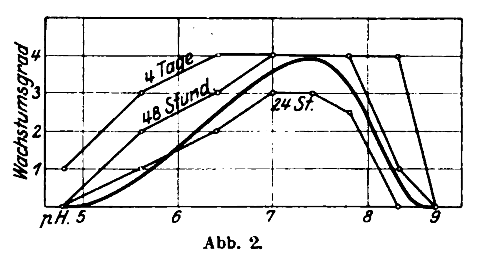


Abb. 2.

Sowohl aus den Tabellen als auch aus der Abb. 2 geht hervor, daß die saure Grenze etwa um $p_H = 5$ bis 5,5, die alkalische um $p_H = 8,5$ liegt. Das Optimum fällt in allen Fällen zwischen $p_H = 7,0$ und $p_H = 7,6$.

Wenn wir den Tetanusbacillus mit anderen Mikroorganismen vergleichen (siehe Dernby, 1921), geht hervor, daß er in einer geraden breiten Zone der Wasserstoffionenkonzentration wächst und in dieser Hinsicht B. subtilis und gewissen anaeroben Bakterien, wie B. histolyticus, B. sporogenes usw. ähnelt. Dagegen unterscheidet er sich höchst bedeutend von B. diphtheria, Pneumokokkus u. a. pathogenen Mikroorganismen, welche nur in einer sehr engen Zone der Wasserstoffionenkonzentration leben können.

Die verschiedenen Stämme, sowohl die englischen als auch die dänischen haben sich ähnlich so verhalten.

Aus dem Vorstehenden geht hervor, daß lediglich um gutes Wachstum zu erhalten, die Wasserstoffionenkonzentration des Substrates nicht allzu streng kontrolliert zu werden braucht, aber es ist nicht das Wachstum sondern die Toxinbildung, welche die

Hauptsache ist, und wie diese letztere sich zur Wasserstoffionenkonzentration verhält, wird im nächsten Abschnitt gezeigt.

b) Die Veränderungen der Wasserstoffionenkonzentration des Substrates durch die Tetanusbacillen.

Viele Mikroorganismen haben die Fähigkeit Zuckerarten zu vergären, bei welchem Prozeß Säuren entstehen, d. h. die Wasserstoffionenkonzentration erhöht wird.

Wie v. Eisler und Pribram nach den meisten Autoren angeben, sollen Traubenzucker oder andere Zuckerarten sehr günstig für das Wachstum sein.

Wir haben nachstehend einige Versuche gemacht, um die Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration sowohl in zuckerfreien wie in zuckerhaltigen Substraten zu verfolgen.

Die Tabelle V zeigt einen Versuch, wo wir autolysierte zuckerfreie Bouillon angewendet haben. Das Wachstum war gut aber doch nicht so üppig wie in der zuckerhaltigen Bouillon.

Tabelle V.
Veränderungen des p_H in autolysierter Bouillon.
Aerobe Züchtung. Dänische Bazillen. Temperatur 37°.

Versuchsdauer	p_H	Wachstumsgrad
Im Anfang	7,5	—
10 Std.	7,5	0
20 „	7,5	1
2 Tage	7,4	2
4 „	7,4	3
8 „	7,4	3
12 „	7,4	3

Tabelle V zeigt, daß in zuckerfreien Nährlösungen fast gar keine Veränderung in der Wasserstoffionenkonzentration eintrat. In Tabelle VI haben wir dieselbe Bouillon angewendet, aber mit

Tabelle VI.
Veränderungen des p_H in autolysierter Bouillon + — 0,5% Glucose.
Aerobe Züchtung. Dänische Bacillen. Temp. 37°.

Versuchsdauer	p_H	Wachstumsgrad
Im Anfang	7,6	—
10 Std.	7,6	0
20 „	7,1	1
2 Tage	6,8	2
4 „	6,6	3
8 „	6,6	3
12 „	6,6	3

Zusatz von 0,5% Glykose. Das Wachstum ist hier ungefähr dasselbe wie im vorigen Fall, aber die Wasserstoffionenkonzentration ist bedeutend mehr verändert. Nach 2 Tagen ist hier $p_H = 6{,}8$ geworden, und dann auf dem Endwert $p_H = 6{,}6$ stehen geblieben.

Tabelle VII zeigt einen ähnlichen Versuch, wo gewöhnliche, frisch zubereitete ordinäre Bouillon angewendet wurde. Diese enthält ja geringe Mengen Zucker. Auch hier sieht man, daß die Wasserstoffionenkonzentration während des Wachstums erheblich erhöht worden ist.

Tabelle VII.

Veränderungen des p_H in ordinärer nicht autolysierter Bouillon.

Aerobe Züchtung. Englische Bacillen. Temp. 37°.

Versuchsdauer	p_H	Wachstumsgrad
Im Anfang	7,9	1
20 Std.	7,8	3
2 Tage	7,0	4
3 „	6,8	4
6 „	6,8	4
10 „	6,8	4

Tabelle VIII zeigt eine Zusammenstellung der Resultate bei einigen in großem Maßstab ausgeführten Versuchen.

Tabelle VIII.

p_H-Veränderungen in verschiedener Bouillons.

Nr.	Bouillon	p_H	
		Im Anfang	Nach 12 Tagen
1	Ord.	7,6	7,0
2	„	8,0	6,7
3	„	7,6	ca. 5
4	Trypsin	8,1	7,3
5	Trypsin + — 0,1% Glykose	8,1	6,9
6	„ „	8,0	6,2

Diese Tabelle VIII zeigt, daß in den meisten Fällen die Bouillon saurer wird, und zwar in gewissen Fällen höchst bedeutend. Mitunter ist das Substrat so sauer geworden wie etwa $p_H = 5$.

Wir sind also berechtigt zu sagen, daß die Tetanusbacillen in zuckerhaltigen Substraten die Wasserstoffionenkonzentration erhöhen. Wir haben keinen wesentlichen Unterschied in diesem Verhältnis bei aerober und anaerober Züchtung gefunden.

Einige Autoren geben an, daß sich während des Wachstums beträchtliche Mengen von Basen bilden. Das ist möglich, allerdings haben wir während der ersten 14 Tage nie eine erhöhte Alkalinität beobachtet. Nur in sehr alten Kulturen (mehr als 4 Wochen alt) haben wir eine Alkalinität von $p_H = 8$ oder mehr gefunden. Dies beruht wohl wahrscheinlich auf dem autolytischen Zerfall der Bacillen und der Spaltung von Eiweißstoffen der Bouillon durch die freigewordenen proteolytischen Enzyme.

Dies Verhältnis bemerkt man noch deutlicher und schneller bei B. proteus oder B. subtilis. Ist das Ausgangs-$p_H = 7{,}5$, so sinkt es in den ersten Tagen auf etwa $p_H = 7{,}0$, aber gleichzeitig damit, daß die Bakterien zerfallen, steigt p_H und ist nach einigen Tagen die Alkalinität etwa $p_H = 8$—9 geworden.

Es ist eine seit lange bekannte Tatsache, daß Tetanusbacillen Gelatine nur langsam verflüssigen. Wir haben einige Versuche über die proteolytische Gruppe dieser Bacillen gemacht, und wenn diese auch nachweisbar sind, zeigen sie doch außerordentlich schwache proteolytische Wirkungen. Bei Tetanusbacillen haben wir keine solche eiweißspaltenden Fermente, wie es der Fall mit z. B. B. subtilis oder B. proteus ist.

c) Die Einwirkung von Phosphationen auf das Wachstum der Tetanusbacillen.

Eine Methode, um die Wasserstoffionenkonzentration in biologischen Flüssigkeiten konstant zu halten, ist, sogenannte Puffermischungen zuzusetzen, so z. B. Phosphatlösungen, wie sie beim Studium der Pneumokokken und der Diphtheriebacillen (Dernby und Avery (1918), Dernby und David (1921) angewendet wurden.

Aber eine Bedingung ist selbstredend, daß die Phosphatlösungen nicht auf das Wachstum der Tetanusbacillen einwirken dürfen. In Tabelle IX sind einige Resultate angegeben, wo verschiedene Phosphatkonzentrationen angewendet worden sind.

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß auch relativ mäßige Konzentrationen von Phosphaten das Wachstum hemmen. Und um eine gute Pufferwirkung zu erzielen, muß man eine Konzentration von mindestens 0,1 m haben. Daher scheint es nicht zweckmäßig, beim Studium der Tetanusbacillen mit Phosphatpuffern zu arbeiten, und wir haben dies auch vermieden.

Tabelle IX.

Einfluß von Phosphationen auf das Wachstum der Tetanusbacillen.

Dänische Bacillen. $p_H = 7,6$. Temp. 37°.

Phosphatkonzentration in Mol.	Wachstumsgrad nach Tagen		
	1	2	5
Ohne Phosphat	0	3	4
0,05	0	2	4
0,1	0	1	3
0,2	0	0	3
0,5	0	0	0

IV. Die Stabilität des Tetanustoxins in bezug auf die Wasserstoffionenkonzentration.

Im vorhergehenden Abschnitt haben wir das Wachstum der Tetanusbacillen bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration studiert, und dabei gefunden, daß das Optimum ziemlich breit ist. Aber es ist eine schon lange bekannte Tatsache, daß gutes Wachstum nicht mit guter Toxinbildung parallel geht. Wir wollten nun die optimale Wasserstoffionenkonzentration für die Toxinbildung ermitteln, und der direkte Weg wäre derselbe, den wir früher betreten haben, um das Diphtherietoxin zu studieren (Dernby und David, 1921), d. h. Tetanusbacillen in derselben Bouillon, wo nur die Wasserstoffionenkonzentration variiert worden ist, zu kultivieren, und nach gewissen Zeiten Proben zu entnehmen, um den Toxingehalt zu bestimmen. In der Tat haben wir mehrere solche Reihen versucht, aber auf Grund der bereits erwähnten Schwierigkeiten, der Unmöglichkeit die Wasserstoffionenkonzentration konstant zu erhalten, der „Unberechenbarkeit" der Bacillen usw., haben wir keine einwandfreien eindeutigen Resultate erzielt, die wert wären publiziert zu werden.

Das Problem ist: Bei welcher Wasserstoffionenkonzentration bekommt man das stärkste Toxin und nach welcher Zeit? Oder mit anderen Worten, in welcher Zone der Wasserstoffionenkonzentration ist das Toxin stabil unter denselben Bedingungen, wie wenn das Toxin in der Praxis, d. h. bei 37° und im dunklen Zimmer, dargestellt wird?

Um dieses Problem klarzulegen müßten wir einen indirekten Weg einschlagen und von bereits fertigem, starkem Toxin ausgehen.

Es ist eine altbekannte Tatsache, daß viele Faktoren das Toxin zerstören. Vor allem wirken oxydierende Substanzen und das Sonnenlicht zerstörend, wie Behring (1900), Sieber (1901) und Loewenstein (1903) gezeigt haben. Aber diese Phasen des Problems werden hier völlig außer Betracht gelassen und wir wenden uns ausschließlich dem Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration zu. Schon Kitasato (1891) und Fermi und Pernossi haben ausgesprochen, daß sowohl Säuren als Alkalien das Toxin schwächen oder zerstören, am stärksten jedoch Säuren. Saure Reaktion wird überhaupt als schädlich für die Toxinbildung angesehen.

Unseres Wissens sind jedoch keine neueren Arbeiten veröffentlicht, wo man die Stabilität in bezug auf Wasserstoffionenkonzentration studiert hat.

Es versteht sich von selbst, daß die Wasserstoffionenkonzentration nicht der einzige Faktor ist, der die Toxinbildung bestimmt, aber dennoch muß er als einer der allerwichtigsten angesehen werden. Man könnte denken, daß sich in irgendeiner Bouillon, die mißglückt war, irgendwelche andere Stoffe gebildet hatten, welche das Toxin zerstören. Um dies in einfacher Weise festzustellen, haben wir folgenden Kontrollversuch gemacht.

Zu einem schon fertigen starken Toxin wurde alte Bouillon zugesetzt, welche kein Toxin gegeben hatte. Diese alten Kulturen waren mit englischen Stämmen inokuliert und hatten 13 Tage gestanden. p_H vor der Aussaat 8,2, nachher auf $p_H = 5,8$ gesunken. Diese Bouillon wurde durch Papier und Berkefeldfilter filtriert und steril aufbewahrt. Zu 1 ccm Probetoxin, welches $p_H = 7,8$ aufwies, wurden in a) 9 ccm Kochsalzlösung, in b) und c) zwei Proben von 9 ccm atoxischer Bouillon, die zuvor alkalisiert und auf $p_H = 7,8$ gesetzt waren, zugesetzt. Die Toxizität dieser Mischungen wurde vorher geprüft, die Mischungen in Thermostaten von 37° eingestellt. Nach in Tabelle X angegebenen Zeiten wurden Toxinproben entnommen.

Tabelle X zeigt deutlich, daß in diesen zwei Bouillons, 368 und 369, keine spezielle toxinzerstörenden Substanzen vorhanden waren. Wenn sie nur alkalinisiert worden waren, haben sie das schon fertige Toxin ebensowenig wie die Kochsalzlösung beeinflußt. Man kommt dann zu der Schlußfolgerung, daß wenn in diesen Bouillons Toxin vorhanden war, es durch die gebildeten Wasserstoffionen zerstört worden wäre.

Tabelle X.

Mischungen von atoxischen Bouillons mit gutem Toxin.

a) 1 ccm Toxin Nr. 199 + 9 ccm Kochsalzlösung,
b) 1 ccm Toxin + 9 ccm Bouillon Nr. 368,
c) 1 ccm Toxin + 9 ccm Bouillon Nr. 369,
d) 10 ccm Bouillon 368 (atoxisch),
e) 10 ccm Bouillon 369 (atoxisch).

Temp. 37°. p_H — 7,6.

Nr.	Maus tot nach Tagen					
	Im Anfang (Kontrolle)		24 Stunden im Thermostat.		5 Tage im Thermostat.	
	0,01 ccm	0,001 ccm	0,01 ccm	0,001 ccm	0,01 ccm	0,001 ccm
1			$2^1/_2$	8	$2^1/_2$	10
2	2	4	3	9	2	8
3			2	4	$2^1/_2$	—
4	0 Tetanus	0 Tetanus	0 Tetanus	0 Tetanus	0 Tetanus	—
5	0 Tetanus	0 Tetanus	0 Tetanus	0 Tetanus	0 Tetanus	—

Von großer Bedeutung wird es daher sein, die Toleranz des Toxins bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen zu studieren. In Tabelle XI und XII sind ein paar derartige Versuche angegeben. Die Versuche wurden teils mit einem Toxin Nr. 199, das mehr als 3 Jahre im Eisschrank gestanden hatte, und konstant an Stärke war, teils mit einem neuen Toxin, Nr. 375, ausgeführt. Die Versuche wurden folgendermaßen ausgeführt: Zuerst wurde ausprobiert, wieviel n-Alkali oder Säure zu 10 ccm Toxin zugesetzt werden sollte, um eine gewünschte Wasserstoffionenkonzentration zu erhalten. Dann wurde in fünf Probiergläser je 10 ccm Toxin und so viel Säure oder Alkali gegossen, wie aus dem Versuch hervorging, und dann mit steriler Kochsalzlösung bis auf 12 ccm aufgefüllt. Die Säure und Natronlauge waren vorher sterilisiert. Die Reagenzröhrchen waren mit einer 1 cm dicken Schicht flüssigem Paraffinöl versehen. Sämtliche Manipulationen waren unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Die Reagenzgläser wurden im Dunkeln im Thermostat bei 37° aufgestellt. Nach den in der Tabelle angegebenen Zeiten wurde 1 ccm herausgenommen und Verdünnungen auf $^1/_{100}$, $^1/_{1000}$ und $^1/_{10\,000}$ gemacht, die alsdann in gewöhnlicher Weise an weißen Mäusen geprüft wurden.

In dem Versuch in Tabelle XI wurde die Wasserstoffionenkonzentration von $p_H = 5{,}4$ auf $p_H = 8{,}5$ variiert und die Toxizität nach 24 Stunden im Thermostat geprüft. Das ursprüngliche Toxin hatte $p_H = 7{,}7$.

Tabelle XI.

Optimales p_H für die Toxinstabilität.

10 cmm Toxin Nr. 199 + NaOH oder HCl + Wasser = 12 ccm. Unter Paraffinschicht aufbewahrt im Termostat bei 37°. Versuchsdauer 20 Stunden.

Nr.	p_H	Maus tot nach Tagen	
		0,01 ccm	0,001 ccm
1	5,4	0 Tetanus	0 Tetanus
2	6,2	2	4
3	7,1	2	5
4	8,0	$2^1/_2$	Lebt noch 10 Tage, aber hat Tetanus
5	8,5	$2^1/_2$	do.

0 Tetanus bedeutet, daß das Versuchstier keine Tetanussymptome zeigte.

Aus Tabelle XI geht hervor, daß sämtliche Mäuse, sowohl die mit 0,01 als auch die mit 0,001 ccm eingespritzten starben oder schweren Tetanus bekamen, außer in dem Falle, wo das Toxin bei einer Wasserstoffionenkonzentration von p_H = 5,4 vorbehandelt war. In diesem Falle scheint jede Spur von Giftigkeit zerstört zu sein. Es ist also deutlich, daß Säurereaktion das Toxin zerstört. In diesem Fall war die Zerstörungsgrenze auf der alkalischen Seite nicht erreicht, aber man sieht deutlich, daß in den 2 Fällen, wo p_H 8,0 und 8,5 betrug, das Toxin geschwächt war.

Tabelle XII.

Optimales p_H für die Toxinstabilität.

10 ccm Toxin Nr. 375 + NaOH oder HCl + Wasser = 12 ccm. Unter Paraffinschicht aufbewahrt im Thermostat bei 37°.

Nr.	p_H	Maus tot nach Tagen oder Stunden											
		Kontrollprobe im Anfang			Nach 2 Tagen im Thermostat			Nach 6 Tagen im Thermostat			Nach 16 Tagen im Thermostat		
		0,01 ccm	0,001 ccm	0,0001 ccm	0,01 ccm	0,001 ccm	0,0001 ccm	0,01 ccm	0,001 ccm	0,0001 ccm	0,01 ccm	0,001 ccm	0,0001 ccm
1	4,5	12 St.	20 St.	30 St.	0 Tet.	0 Tet.	0 Tet.	—	—	—	—	—	—
2	5,3				0 Tet.	0 Tet.	0 Tet.	0 Tet.	0 Tet.	0 Tet.	0 Tet.	0 Tet.	0 Tet.
8	6,2				12 St.	20 St.	8	1	$1^1/_2$	3	1	2	$2^1/_2$
4	7,2				12 St.	3	4	$1^1/_2$	4	6	$1^1/_2$	3	St. Tet.
5	8,1				12 St.	$2^1/_2$	—	$2^1/_2$	6	St. Tet.	8	St. Tet.	0 Tet.
6	8,8				0 Tet.	0 Tet.	0 Tet.	0 Tet.	0 Tet.	—	0 Tet.	—	—

„0 Tet." bedeutet, daß das Versuchstier keine Tetanussymptome zeigte.
„St. Tet" bedeutet, daß das Versuchstier noch am zehnten Tage lebte, aber doch starken Tetanus aufwies.

In Tabelle XII ist ein ähnlicher Versuch angegeben, wo ein neues Toxin geprüft worden ist. Ein größerer Abschnitt in p_H, von 4,5 bis 8,8 ist hier untersucht. Die Toxizität wurde, außer gleich zu Anfang, nach 2, 6 und 14 Tagen geprüft.

Aus Tabelle XII geht mit aller Deutlichkeit sowohl die saure als auch die alkalische Grenze für die Zerstörung des Toxins hervor. Sowohl in dem Röhrchen, wo p_H 8,8 war, als auch in denjenigen, wo p_H 4,5 und 5,2 betrug, ist das Toxin nach 2 Tagen fort. Das Stabilitätsgebiet für das Toxin liegt also zwischen $p_H = 6$ und $p_H = 8$.

Diese Zerstörung des Toxins scheint ziemlich rasch, d. h. innerhalb ganz weniger Stunden zu erfolgen. Dagegen geht aus der Tabelle hervor, daß das Toxin bei $p_H = 6{,}1$ und $p_H = 7{,}2$ sich während der Zeit, welche der Versuch dauerte, nämlich 14 Tage, relativ unverändert an Stärke gehalten hat. Bei $p_H = 8{,}1$ ist das Toxin langsam geschwächt worden. Es hat nach dem Versuch den Anschein, als ob die Zerstörungsgrenze auf der sauren Seite schärfer markiert wäre als auf der alkalischen.

Da diese saure Grenze auch praktisch von größerer Bedeutung ist als die alkalische, da die gewöhnlichste Ursache eines Mißlingens der Kulturen die ist, daß die Reaktion zu sauer geworden ist, haben wir in Tabelle XIII einen Versuch relatiert, wo diese Grenze näher studiert worden ist. Hierbei wurde als Ausgangstoxin das nämliche angewendet, das in Tabelle XII angegeben ist. Ein p_H-Abschnitt von $p_H = 4{,}5$ bis $p_H = 5{,}9$ wurde untersucht. Die Toxizität ist nach 5 Stunden und nach 2 Tagen geprüft.

Tabelle XIII.

Die Zerstörung des Toxins bei sauren Reabilien.

10 ccm Toxin Nr. 375 + HCl + Wasser = 12 ccm.

Nr.	p_H	Maus tot nach Tagen						
		Im Anfang Kontrolle		Nach 5 Stunden im Thermostat		Nach 8 Tagen im Thermostat		
		0,01 ccm	0,001 ccm	0,01 ccm	0,001 ccm	0,01 ccm	0,001 ccm	0,0001 ccm
1	4,5	1	2	0 Tet.	0 Tet.	0 Tet.	0 Tet.	0 Tet.
2	5,3			0 Tet.	0 Tet.	0 Tet.	0 Tet.	0 Tet.
3	5,7			2	4	$2^1/_2$	4	8
4	6,0			$1^1/_2$	3	2	$2^1/_2$	4

Wenn $p_H = 4{,}5$ und 5,3 ist, ist das Toxin schon nach 5 Stunden Behandlung im Thermostat bei 37° vernichtet, und in praktischer Hinsicht kann dies als eine momentane Zerstörung an-

gesehen werden. In den 2 anderen Fällen, wo $p_H = 5,7$ und 6,0 war, ist das Toxin nach 5 Stunden ein wenig und nach 2 Tagen mehr geschwächt.

Nach diesen Versuchen kann man also sagen, daß die absolute Zerstörungsgrenze auf dem sauren Gebiet $p_H = 5,5$ ist. Selbstredend muß bei praktischen Arbeiten diese Grenze als $p_H = 6,0$ gesetzt werden. Um Toxin in einer Bouillon erwarten zu können, darf daher die Wasserstoffionenkonzentration nicht größer sein als $p_H = 6,0$.

Man könnte in Frage stellen, ob diese Zerstörung absolut oder reversibel ist. Verschiedene Autoren haben diese Frage studiert, und sind zu dem Resultat gekommen, daß die Zerstörung irreversibel ist. In Tabelle XIV ist ein diesbezüglicher Versuch angegeben, wo wir ein Toxin anwendeten, das ursprünglich ein p_H von 7,7 hatte, einen Teil davon zur Kontrolle in ein Reagenzglas füllten, zu zwei anderen b) und c) so viel sterile Säure zusetzten, daß $p_H = 5,1$ wurde und alle drei Reagenzgläser in das Thermostat bei 37° einstellten. Nach 4 Stunden wurde das Röhrchen c durch Alkali neutralisiert und p_H wieder auf 7,7 gesetzt. Danach wurden die Röhrchen wieder 20 Stunden in das Thermostat gestellt und dann auf die Toxizität geprüft.

Tabelle XIV.

Die irreversible Zerstörung des Toxins.

a) Toxin Nr. 375. $P_H = 7,6$, b) Dasselbe + HCl, $p_H = 5,2$. 4 Stunden im Thermostat bei 37° gestellt, c) Probe b aus Thermostat genommen nach 4 Stunden und durch Zusatz von NaOH wieder auf $p_H = 7,6$ gebracht. Im Thermostat wieder gestellt 20 Stunden vor Toxinprüfung.

Maus gestorben nach Tage					
a		b		c	
0,01 ccm	0,001 ccm	0,01 ccm	0,001 ccm	0,01 ccm	0,001 ccm
$^1/_2$	1	0 Tetanus	0 Tetanus	0 Tetanus	0 Tetanus

Tabelle XIV zeigt deutlich, daß während die Probe a ungeschwächte Toxizität zeigte, sowohl b als c ihr Toxin vollständig verloren hatten. Dieser Versuch bestätigt also die von früheren Verfassern hervorgehobene Irreversibilität der Toxinzerstörung.

Die Stabilität des Tetanustoxins kann auch graphisch dargestellt werden. Zu diesem Zweck haben wir die Zahlen aus

Tabelle XII genommen, welche sich auf 6 Tage Aufbewahrung im Thermostat bei 37° beziehen. (Siehe Abb. 3.) Als Abszisse ist p_H gewählt, als Ordinate die inverse Todeszeit der Mäuse, wenn eine Todeszeit von 24 Stunden mit 1 bezeichnet wird.

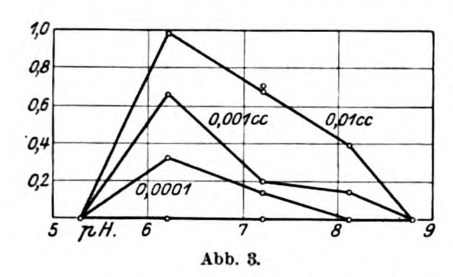


Abb. 3.

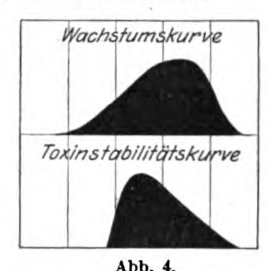


Abb. 4.

Zuletzt ist in Abb. 4 eine Zusammenstellung von der Wachstumskurve der Bacillen und der Stabilitätskurve des Toxins gegeben.

V. Die Kontrollierung der Wasserstoffionenkonzentration bei Herstellung von Tetanustoxin in großem Maßstabe.

Bei der Darstellung von Tetanustoxin in großem Maßstabe hat sich oft gezeigt, daß in manchen Fällen die Kulturen, trotz guten Wachstums und typischen Tetanusgeruches, kein Toxin lieferten. Im Vorhergehenden war es auch vorgekommen, daß während langer Perioden so gut wie jede Kultur mißlang. Wir hatten zuvor dieselbe Erfahrung gemacht bei der Darstellung von Diphtherietoxin. Vor der Kontrollierung der Wasserstoffionenkonzentration kam es öfter vor, daß nur ganz wenige von den gesäten Kulturen Toxin lieferten (siehe Dernby und David 1921), aber nachdem wir seit August 1919 konsequent die Wasserstoffionenkonzentration in sämtlichen Kulturen reguliert haben, ist während dieser 2 Jahre nicht eine einzige Kultur fehlgeschlagen.

In Analogie hiermit könnte man möglicherweise denken, daß eine konsequente Berücksichtigung der Wasserstoffionenkonzentration auch bei Tetanuskulturen zu einer konstanten Toxinbildung würde führen können. Doch muß nochmals hervorgehoben werden, was bereits in der Einleitung betont worden ist, daß noch mancherlei andere Faktoren denkbar sind, die auf die Toxinbildung einwirken können.

Welche Schlußfolgerungen können wir aus den Untersuchungen ziehen, die im vorhergehenden Kapitel in bezug auf

den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Toxinbildung besprochen wurden? Erstens ist es klar, daß die Tetanusbacillen sehr wohl bei einer Wasserstoffionenkonzentration leben können, wo das Toxin nicht haltbar ist. Die Grenzen für diese Haltbarkeit des Toxins haben wir nachgewiesen, und hieraus können wir die wichtige Schlußfolgerung ziehen, daß es ein absolut unweigerliches Erfordernis ist, daß die Wasserstoffionenkonzentration in der Bouillon nicht größer sein darf als entsprechend $p_H = 5{,}5$. Es gilt demnach, darauf zu achten, daß die Kulturen nicht so sauer werden, wie dieser Wert angibt, und natürlich darf man in der Praxis nicht bis zum Grenzwert gehen, sondern muß sich an $p_H = 6$ als Minimum halten.

Nun haben wir zuvor gezeigt, daß die Tetanusbacillen nicht gern in absolut zuckerfreier Bouillon wachsen. Im Gegenteil scheint ein extra Zuckerzusatz das Wachstum zu fördern. Und in zuckerhaltigen Bouillons pflegt fast immer p_H während des Wachstums zu sinken.

Tabelle XV.

Resultate aus der Herstellung von Toxin im großen Maßstabe.

Im Thermostat bei 37°. Toxin geprüft nach 12—14 Tagen.

Nr.	Diarii Nr.	Züchtungsweise	Bouillon	Bazillen	p_H Im Anfang	p_H Nach 14 Tagen	Toxizität. Minimale tödliche Dose	Bemerkungen
1	330	Aerob.	Ord.	D.	7,9	6,3	0 Toxin	
2	336	Anaer.	"	D.	7,6	6,6	0 "	
3	337	"	"	D.	7,6	6,8	0 "	
4	362	"	"	E.	8,2	5,0	0 "	
5	364	"	"	E.	8,1	5,0	0 "	
6	365	"	"	E.	8,1	5,0	0 "	
7	370	"	"	E.	8,2	7,6	0 "	Spärliches Wachstum
8	371	"	"	E.	8,2	7,5	0 "	
9	372	"	Trypsin	E.	8,2	7,4	0 "	
10	338	"	Ord.	D.	7,8	7,2	0,0001	
11	339	"	Tryps. + 0,1% Glykose	D.	8,2	7,0	0,001	
12	340	"	Trypsin	D.	8,2	7,5	0,0001	
13	373	Aerob.	Tryps. + 0,1% Glykose	E.	8,2	7,2	0,0001	
14	374	Anaer.	Dsgl.	E.	8,2	7,0	0,0001	
15	382	"	Ord.	E.	8,1	7,0	0,0001	
16	383	"	"	E.	8,1	7,0	0,0001	
17	375	"	"	E.	8,2	8,0	0,0001	Realkalinisiert nach 2 Tage, wenn p_H ca. 5,5 war
18	376	"	"	D.	8,2	8,0	0,0001	
19	381	"	"	E.	8,0	8,0	0,0001	

Dies durch Pufferzusatz zu verhindern, ist auch nach unseren Untersuchungen nicht möglich, da die Bacillen eine für ihren Zweck hinreichend hohe Konzentration nicht vertragen können.

Daher sind wir bei einem einfacheren Verfahren stehen geblieben, nämlich während des Verlaufes der Inkubationszeit die Wasserstoffionenkonzentration zu kontrollieren und wenn p_H zu viel gesunken ist, eine erneuerte Alkalinisierung vorzunehmen, was unten besprochen wird.

In Tabelle XV geben wir eine Zusammenstellung von einigen der gewonnenen Resultate bei der Herstellung von Tetanustoxin in großem Maßstabe, sowohl Kulturen, die Toxin geliefert haben, als auch solche, die fehlgeschlagen sind. Fast sämtliche Kulturen sind am 12. bis 14. Tage nach der Aussaat zur Toxinprüfung genommen. „Anaer." bedeutet anaerobe, „Aerob." aerobe Züchtung. Die ordinäre, nach der in Abschnitt II angegebenen Methode bereitete, Bouillon ist mit „Ord.", die trypsinbehandelte mit „Trypsin" bezeichnet. Die Stärke des Toxins ist in „minimaler letaler Dosis" gemessen, d. h. der kleinste Teil eines Kubikzentimeters, der erforderlich ist, eine weiße Maus zu töten. Wenn kein Toxin gefunden wurde, haben wir dies durch 0 Toxin ausgedrückt.

In Nr. 1—9 sind solche Kulturen aufgenommen, die kein Toxin abgegeben haben. In einigen derselben ist p_H so stark gesunken wie bis $p_H = 5$. Dagegen hat sich in einigen Fällen, trotzdem die Reaktion immer noch alkalisch ist, dennoch kein Toxin gebildet. In diesen Fällen glauben wir hierbei bemerkt zu haben, daß die Tetanusbacillen nur spärlich gewachsen sind.

Doch haben wir auch bisweilen gefunden, daß trotzdem das Wachstum gut war und die Reaktion alkalisch, kein Toxin gebildet war; sowohl unter Anwendung von einem einzigen Stamm als auch Mischungen von verschiedenen, welche alle als gute Toxinbilder bekannt waren.

In Nr. 10—21 sind Kulturen angegeben, die Toxin geliefert haben. Zu beachten ist, daß sowohl ordinäre als auch Trypsinbouillon Toxin gegeben hat und zwar sowohl unter aeroben als anaeroben Bedingungen. Sowohl dänische wie englische Stämme haben Toxin gegeben. Was das Interessanteste ist, ist daß in sämtlichen Fällen der Endwert des p_H alkalisch oder neutral ist. Wir haben nie beobachtet, daß brauchbares Toxin gebildet war,

wenn der Endwert niedriger als $p_H = 6,8$ ist. Nach den Resultaten in Abschnitt IV, über die Stabilitätszone des Tetanustoxins, sollte man glauben, daß das Toxin auch sehr wohl in einer p_H-Zone von 5,8 bis 6,8 gebildet werden könnte. Das praktische Resultat deckt sich daher nicht völlig mit dem theoretisch erwarteten. Möglicherweise könne dies auch der Fall sein, wenngleich wir seither niemals eine gute Toxinbildung beobachtet haben, wenn das End-p_H niedriger als 6,8 gewesen ist.

Selbst wenn der Satz, daß falls das End-p_H größer als 6,8 ist, Toxin erwartet werden kann, nicht unbedingt stichhaltig ist, scheint die Umkehrung: wenn man für Immunisierung genügend starkes Toxin bekommt, ist der End-p_H-Wert niemals sauer, ziemlich zutreffend.

Daher sind wir bei der Methode stehen geblieben, nach 2 Tagen nach der Aussaat, wenn, wie in Abschnitt III gezeigt ist, p_H seinen Minimalwert schon erreicht hat, eine Probe herauszunehmen, p_H darin zu bestimmen, und wenn sich dann herausstellt, daß $p_H < 7,0$ ist, bestimmen wir, wieviel Natriumhydroxyd zugesetzt werden soll, um p_H auf 7,5 bis 8,0 zu bringen. Die berechnete Menge steriles Natriumhydroxyd wird vorsichtig und steril zur Kultur gegeben, und dann muß diese weitere 10—12 Tage stehen, bevor die Toxinprüfung erfolgt. Daß p_H wieder sinken sollte, braucht man nicht zu befürchten.

In der Tabelle XV haben wir in Nr. 19, 20 und 21 Beispiele von dergleichen erneuten Alkalinisierungen, und sie haben alle guten Erfolg gezeigt.

Um ein endgültiges Urteil über die Zuverlässigkeit dieser Realkalinisierungsmethode fällen zu können, sind natürlich Beobachtungen während einer langen Zeit von in großem Maßstabe ausgeführten Kulturen erforderlich. Doch glauben wir schon jetzt sagen zu können, daß die Methode besonders vielversprechend ist, und selbst wenn dieselbe Präzision wie bei der Darstellung von Diphtherietoxin nicht sollte erreicht werden können, dürfte das Resultat doch bedeutend besser werden, als wenn man nach wie vor die Kulturversuche ausführt ohne auf die Wasserstoffionenkonzentration und ihre Veränderungen achtzugeben.

Schlußfolgerungen.

1. Die Tetanusbacillen können sich in einer verhältnismäßig breiten Zone der Wasserstoffionenkonzentration, $p_H = 5$ bis

$p_H = 8,5$ entwickeln. Das Wachstumsoptimum fällt zwischen $p_H = 7$ bis 7,6.

2. Die Stabilitätszone des Tetanustoxins ist enger als die des Wachstums und liegt zwischen $p_H = 5,8$ und $p_H = 8$. Bei niedrigerem p_H-Werte als 5,8 (also im sauren Gebiet) stellt sich eine vollständige, irreversible und sehr rasche Zerstörung des Toxins ein. Bei einem p_H höher als 7,5 vollführt sich die Zerstörung mehr allmählich. Das Stabilitätsoptimum liegt zwischen $p_H = 6,0$ und $p_H = 7,5$.

3. Bei der Herstellung des Tetanustoxins in großem Maßstabe ist streng darauf zu achten, daß das Medium nicht sauer wird (p_H nicht kleiner als 6,8).

4. Das Ausgangs-p_H des Mediums soll 8 sein. Sollte bei einer nach 2 Tagen vorzunehmenden Prüfung des Mediums das p_H niedriger als 6,8 sein, ist eine erneuerte Alkalinisierung nötig.

Zuletzt ist es uns eine Freude, dem Direktor des Laboratoriums Dr. Carl Kling, unseren Dank für die Anregung dieser Arbeit und das Interesse, das er daran genommen hat, auszusprechen.

Literatur.

Behring, Zeitschr. f. Hyg. **12**, 1. 1892. — Blanc, J., Thesis Paris 1921. — Brieger, Dtsch. med. Wochenschr. 1887. — Brieger, Zeitschr. f. Hyg. **19**, 101. 1895. — Buchner, Dtsch. med. Wochenschr. 1903, S. 450. — Clark, W. M., Journ. of infect. dis. **17**, 109. 1915. — Clark, W. M. und Lubs, H. A., Journ. of bacteriol. **11**, 1. 1917. — Clark, W. M., The Determination of Hydrogen Ions. Williams & Wilkins, Baltimore 1920. — Debrand, Ann. de l'inst. Pasteur **16**, 427. 1902. — Dernby, K. G., diese Zeitschr. **81**, 107. 1917. — Dernby, K. G. und O. T. Avery, Journ. of exp. med. **28**, 345. 1918. — Dernby, K. G. und H. David, Journ. of pathol. a. bacteriol. **24**, 150. 1921. — Dernby, K. G., Ann. de l'inst. Pasteur **35**, 277. 1921. — Eisler, M. v. und E. Pribram, Tetanustoxin, Kraus und Levaditis, Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsforschung. Jena 1908. — Fermi und Pernossi, Zentralbl. f. Bakteriol. usw. **15**, 303. 1894. — Foster, L. R. und S. B. Randall, Journ. of bacteriol. **6**, 143. 1921. — Kitasato, Zeitschr. f. Hyg. **7**, 225. 1890 und **10**, 267. 1891. — Loewenstein, Wien. klin. Wochenschr. 1903, — Michaelis, L., Wasserstoffionenkonzentration. Berlin 1914. — Mudge, C., Journ. of bacteriol. **11**, 403. 1917. — Reymann, G. C., Meddelelser fra Statens Seruminstitut. Kopenhagen **9**, 65. 1917. — Sieber, Zeitschr. f. physiol. Chem. **32**, 572. 1901. — Sörensen, S. P. L., Enzymstudien II. Diese Zeitschr. **21**, 131. 1909. — Uschinsky, Zentralbl. f. Bakteriol. usw., **14**, 316. 1893. — Walpole, G. S., Biochem. Journ. **5**, 207. 1911.

Untersuchungen über den Einfluß des Calciummangels in der Nahrung auf den respiratorischen Grundumsatz.

Von

Fausto Pedotti.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 25. Juli 1921.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

I. Einleitung.

Der Mineralstoffwechsel ist bisher um seiner selbst willen untersucht worden, das heißt, man hat versucht, festzustellen, wieviel ein Lebewesen von den einzelnen Mineralien braucht, um gesund zu bleiben und, wenn es ein junges Tier ist, um zu wachsen. Man hat ferner untersucht, welche Erscheinungen im Gesamtzustande des Tieres beobachtbar sind, wenn, soweit als es möglich ist, die Nahrung vollständig derjenigen Mineralien entbehrte, welche Gegenstand der jeweiligen Untersuchung waren. Im wesentlichen handelte es sich bei der Untersuchung über den Mineralstoffwechsel um die Unentbehrlichkeit bestimmter anorganischer Nährstoffe als Bausteine des Organismus.

Die Untersuchungen betrafen namentlich Eisen, Calcium, Phosphor und Chlor. Bei allen diesen ist ihre Rolle als Baumaterial ohne weiteres klar, aber es muß auch an andere Gesichtspunkte gedacht werden als die bloße Erhaltung des Körperzustandes, wie die Tatsache des Wachstums, die Ausbildung der einzelnen Gewebe und ähnliches. Es muß auch daran gedacht werden, wie bei Mangel und Überschuß sich an einzelnen Mineralien die Funktionen des Körpers abspielen.

Seitdem durch die Arbeiten von Jacques Loeb das Problem der Ionenwirkung im Organismus ein bedeutsames Kapitel biologischer Forschung geworden ist, müssen auch die Gesichts-

punkte, die dort sich eröffnet haben, auf die Untersuchungen angewandt werden, die sich mit den Stoffwechselwirkungen der einzelnen Mineralien befassen.

Es gibt aber noch ein anderes Gebiet biologischer Forschung, welches neue Ausblicke auf die Fragestellungen der Bedeutung des Mineralstoffwechsels wirft. Das sind Erfahrungen aus der Lehre von der inneren Sekretion. Es sei hier daran erinnert, daß gewisse Experimentaleingriffe, die man an Drüsen mit innerer Sekretion macht, in ihrem Symptomenbild eine gewisse Ähnlichkeit mit den Erscheinungen zeigen, die man bei Fehlen bestimmter Mineralbestandteile beobachten kann. Ich erinnere hier an die vielfach behauptete Ähnlichkeit der parathyreopriven Tetanie mit den Erscheinungen, die man bei wirklichem oder angeblichem Kalkmangel beobachten kann. Noch inniger fast sind die Beziehungen, welche zwischen innerer Sekretion und Mineralstoffwechsel bestehen, bei der Lehre von der Milz, die einerseits eine Rolle als Organ mit innerer Sekretion und andererseits eine recht bedeutsame Rolle im Mineralstoffwechsel spielt.

Die Gedankengänge, welche ich einleitend kurz skizziert habe, regten dazu an, den Einfluß des Mangels bestimmter Mineralien in der Nahrung auf den respiratorischen Grundumsatz zu untersuchen, und ich habe, dieser Anregung folgend, auf Professor Ashers Rat den Einfluß des Kalkmangels in der Nahrung auf den respiratorischen Umsatz untersucht.

Die Wahl des respiratorischen Umsatzes als Mittel, um tiefer in das Verständnis der Bedeutung einzelner Mineralien für den Organismus zu dringen, geschah aus verschiedenen Gründen:

1. Ist der Grundumsatz der Ausdruck der energetischen Gesamtleistungen des ruhenden Organismus; die Leistungsfähigkeit der Zellen drückt sich in verhältnismäßig leicht beobachtbarer Weise sehr gut im Grundumsatz aus.

2. Ist der respiratorische Grundumsatz gerade diejenige Funktion, an welcher die Leistungen der Drüsen mit innerer Sekretion sich so vielfach haben untersuchen lassen.

Von den Mitteln, um beispielsweise die Rolle der Schilddrüse oder der Hypophyse unter physiologischen Bedingungen im Organismus beurteilen zu können, gibt es wenige so geeignete und zuverlässige wie die Beurteilung des respiratorischen Grundumsatzes.

II. Methodik.

Zu meinen Untersuchungen bediente ich mich der Ratte und wandte die Methodik der Feststellung des respiratorischen Stoffwechsels, wie sie im Berner Physiologischen Institut üblich ist, an. Auf eine Beschreibung dieser Methodik will ich verzichten, weil dieselbe von Prof. Ashers Schüler N. Danoff sowie den anderen Benutzern derselben schon eingehend dargelegt worden ist.

Kurz gesagt handelte es sich im Prinzip um die Haldanesche Methode, welche gestattet, Kohlensäurebildung und Sauerstoffverbrauch sowie den respiratorischen Quotienten genau zu ermitteln. Meine Arbeit befaßt sich ausschließlich, als eine einleitende, der weitere Arbeiten mit gleichen Gesichtspunkten folgen sollen, mit dem Einfluß des Calciummangels auf den respiratorischen Grundumsatz. Unschwer wird man dabei auf zwei Gedankengänge seine Aufmerksamkeit lenken.

Einmal wird vielfach behauptet, daß Calciummangel die Erregbarkeit des Nervensystems, übrigens auch der Muskulatur, steigern soll. Da nun der Stoffwechsel unter normalen Bedingungen der Herrschaft des Nervensystems unterstellt ist, darunter auch derjenigen des autonomen Nervensystems, von dem eine besondere Empfindlichkeit gegenüber dem Kalkmangel behauptet wird, könnte erwartet werden, daß der respiratorische Grundumsatz den angeblich erhöhten Erregbarkeitszustand des Nervensystems widerspiegelt.

Sodann ist daran zu denken, daß, wenn Calciummangel im Organismus herrscht, dieser sich ja auch auf die Drüsen mit innerer Sekretion würde geltend machen können und es müßte somit auf diesem unmittelbaren Wege der Grundumsatz beeinflußt werden. Diese Andeutungen mögen genügen, um darauf hinzuweisen, daß von vornherein die Verwickeltheit der Dinge ins Auge gefaßt werden muß, daß wir uns darüber klar sein müssen, mit dem scheinbar einfachen Eingriff des Calciummangels eine in sich geschlossene Kette von Vorgängen gestört zu haben.

Meine Versuchstiere waren Ratten. Diese besitzen wegen ihrer Kleinheit den Vorzug, daß keine großen Depotmengen von Mineralien aufgestapelt sein können, daß die Stoffwechselvorgänge verhältnismäßig rasch in ihnen verlaufen, demnach Änderungen früher zum Ausdruck kommen können als bei großen Tieren. Diesen Vorteilen steht der Nachteil gegenüber, daß bei der Kleinheit dieser Tiere die Nahrung auf das sorgfältigste zusammengesetzt sein muß, damit selbst die kleinen Mengen von Calcium fehlen, welche für die Ratte schon genügend sind.

Da Untersuchungen vorliegen, welche zeigen, wie ganz allmählich erst die Folgen einer unzureichenden Ernährung sich geltend machen — ich erinnere an die Versuche von Martin Benno Schmidt über die Folgen des Eisenmangels —, habe ich mich nicht mit dem bloßen Calciummangel in der Nahrung begnügt. Vielmehr habe ich versucht, noch auf eine andere Weise den Calciumbestand des Organismus herunterzudrücken, und zwar indem ich mich eines Verfahrens bediente, welches ich als „die Methode der Erzeugung biologischer Unterwertigkeit des Calciums" bezeichnen möchte.

Jacques Loeb hat gezeigt, daß die funktionelle Bedeutung der einzelnen Ionen nicht bloß von der absoluten Konzentration derselben abhängt, sondern von der relativen bei Gegenwart von anderen Ionen „antagonistischer“ oder, nach Karl Spiro, „pseudoantagonistischer“ Art. Durch ihn und nachfolgende Forscher wissen wir, daß das Verhältnis $\frac{K}{Ca}$ bei den verschiedensten Funktionen eine Rolle spielt. Ich habe daher der von mir ausgewählten kalkarmen Nahrung — kalkfrei ist wohl nur ein ideales unerfüllbares Postulat — Kalium in Form von Kalium sulfuricum zugesetzt, um damit das nicht entfernbare Calcium biologisch zu entwerten. Die von mir untersuchten Tiere erhielten zuerst in einer längeren Vorperiode eine gewöhnliche Nahrung, um unter normalen Bedingungen ihren Grundumsatz kennenzulernen. Nach Feststellung desselben ging ich zu einer calciumarmen Nahrung über — feines Weißbrot, getrocknetes, mit destilliertem Wasser ausgelaugtes Rindfleisch, reine Margarine, alles mit destilliertem Wasser gekocht.

Diese calciumarme Nahrung wurde zunächst 3 Wochen lang verabreicht, ehe die eigentlichen Versuche begannen. Um die Tiere an fortdauernde Respirationsversuche zu gewöhnen, wurden sie während dieser 3 Wochen mit blinden Respirationsversuchen im Respirationskasten eingeübt. Ich halte diesen Punkt methodisch für sehr wichtig. Erst dann begannen, bei anhaltender calciumarmer Nahrung, die eigentlichen Versuchsperioden. Im Verlaufe derselben setzte ich außerdem noch Kalium sulfuricum in verschiedenen Konzentrationen hinzu, d. h. ich habe die Nahrung mit verschiedenen Kaliumlösungen aufgeweicht und gekocht.

III. Ernährung der Versuchstiere.

Die Zusammensetzung der calciumarmen Nahrung gebe ich in der nachfolgenden Tabelle.

Diese enthält die Nahrungsmenge, welche ich täglich gab, den Calciumgehalt der Nahrungsmittel. (Herr Dr. Liechti, Vorsteher der Schweizerischen agrikultur-chemischen Anstalt in Liebefeld-Bern, hatte die Güte, die Calciumanalysen von Weißbrot, Rindfleisch und Margarine für mich durchzuführen.)

Sie enthält ferner die Berechnung der Ca-Gesamtmenge, welche das Tier bekam, und die Calorienzahl, die in der Nahrung enthalten ist. Laut dieser Tabelle erhielten die Tiere mindestens $^2/_3$ CaO weniger als sie nötig hatten. Der Caloriengehalt der Nahrung sowie der Gehalt an organischen Stoffen, an akzessorischen Nährstoffen und anderen Mineralien war ein genügender. Ich glaube daher behaupten zu dürfen, daß die von mir gegebene Nahrung allen Anforderungen an eine zureichende Nahrung entsprach und nur calciumarm war. Alle älteren Versuche über mineralarme Nahrung sind nach dem jetzigen Stande unserer Kenntnisse mit größter Wahrscheinlichkeit mit dem Fehler behaftet, daß sie auch in bezug auf die akzessorischen Nährstoffe, deren Bedeutung früher unbekannt war, unzureichend waren.

Tabelle I.

CaO-Gehalt in 100,0 Trockensubstanz g		Nahrungsmenge pro Tag und pro Tier g		Gesamt-CaO-Menge in der gegebenen Nahrung g	Calorienzahl *)
Feines Weißbrot	0,0413	Getrockn. Weißbrot	5,0	0,0020650	20,50
Rindfleisch	0,0283	„ Rindfleisch	0,75	0,0002123	3,07
Reine Margarine	0,0098	Margarine	0,5	0,0000490	4,65

*) nach Mohr, Stoffwechseluntersuchungen.

Somit bekommt jedes Tier pro Tag und 100,0 g Körpergewicht 0,00153 g CaO statt wie normal 0,0034 g (Albu und Neuberg, Mineralstoffwechsel). Jedem Tiere kommen 18,81 Calorien pro 100,0 g Körpergewicht zu.

Zur Ergänzung des methodischen Teiles meiner Versuche habe ich noch hinzuzufügen, daß bei einem meiner beiden Versuchstiere, nachdem es hinreichend lange Zeit mit kalkarmer Nahrung ernährt worden war, diese ausgesetzt wurde, indem zur bisherigen Grundnahrung, die für den Bedarf des Tieres als notwendig ausgerechnete Calciummenge in Form von Calcium lacticum zugesetzt wurde, und später habe ich dann eine gewöhnliche Nahrung, bestehend aus grobem Brot, trockenem Rindfleisch, Kondensmilch und Wasser gegeben. Das andere Tier wurde, als nach einer längeren Periode der calciumfreien Nahrung anscheinend ein gewisser Endzustand eingetreten war, getötet, um einer genaueren pathologisch-anatomischen Untersuchung unterzogen zu werden, auf welche ich später eingehen werde.

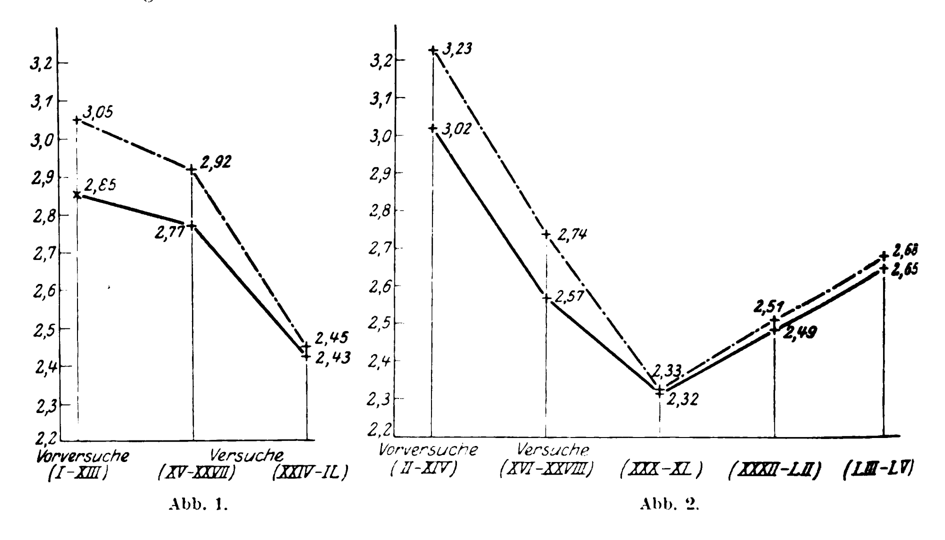


Abb. 1. Abb. 2.

Tabelle II. Rotgezeichnete Ratte.

Nummer des Versuches	Datum 1920—21	Dauer des Versuches Stdn.	Temperatur im Kasten	Temperatur im Raum	Gewicht der Ratte g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Aufnahme g	Respirator. Quotient	CO_2 pro kg u. Stde.	O_2 pro kg u. Stde.	Art der Nahrung	Bemerkungen
1/I	15. XI.	$4^1/_2$	20	16	139,80	0,82	2,10	1,98	0,79245	3,43346	3,14664	Brot, condens. Milch, H_2O sort.	
2/III	17. XI.	$4^3/_4$	20	17	136,43	0,96	1,73	1,69	0,74362	2,6690	2,6079		Ratte nicht nüchtern. Der Versuch wird bei der Ausrechnung der Mittelwerte nicht gezählt.
3/V	18. XI.	$3^1/_2$	21	17	149,26	0,70	2,05	1,49	0,9994	3,924	2,852		
4/VII	19. XI.	4	21	17	137,93	0,90	1,04	1,53	0,7609	2,9658	2,7668		
5/IX	22. XI.	$3^1/_2$	20	16,5	142,25	0,71	1,61	1,40	0,8354	3,2338	2,8120		
6/XI	23. XI.	6	20	16	133,40	0,17	2,49	2,40	0,7352	3,111	3,0735		
7/XIII	25. XI.	5	20	16	132,50	1,20	1,93	1,88	0,7465	2,9132	2,71		
					3 Wochen lang kalkarme Nahrung								
8/XV	14. XII.	5	20	16	142,02	0,85	2,12	2,04	0,7549	2,9855	2,8728	Ca-arme Nahrung*) + H_2O font.	
9/XVII	16. XII.	$3^1/_4$	20	17,5	143,14	0,51	1,30	1,27	0,7436	2,794	2,730		
10/XIX	17. XII.	3	18	15	143,86	0,63	1,35	1,28	0,7660	3,128	2,965		
11/XXI	18. XII.	5	17	14,5	141,49	0,80	2,24	2,15	0.7551	3,166	3,039		
12/XXIII	20. XII.	$3^1/_2$	20	17	147,02	0.51	1,44	1,38	0.7580	2,7984	2,6818		
13/XXV	21. XII.	$3^3/_4$	20.5	16.5	154,17	0,37	1,56	1,41	0.8037	2.69833	2,4380		
14/XXVII	22. XII.	$3^1/_2$	20	16	149,42	0,51	1,49	1,38	0,78433	2,8492	2,6385		+ Abends 28. XII. 5‰ K_2SO_4 puriss. Lösung
15/XXIX	28. XII.	5	20	16	152,97	0.79	1,48	1,45	0,7413	2.4187	2.3698		
16/XXXI	30. XII.	5	20	16	153,49	0.44	2,01	1,99	0.73373	2,619	2.593		+ Abends 31. XII. 10‰ K_2SO_4-Lösung
17/XXXIII	3. I.	5	20	16	158,43	0,51	2,15	2,11	0.7402	2,7141	2,6636		
18/XXXV	4. I.	5	20	16	153.98	0,55	2.06	2.07	0.7229	2,6757	2,6887		
19/XXXVII	7. I.	5	20	16	152,66	0.73	1.90	1,89	0.73025	2,4892	2,4761		+ Abends 8. I. 12‰ K_2SO_4-Lösg.
20/XXXIX	10. I.	5	20	16	154,13	0,33	1,86	1,88	0,7187	2.4136	2,4396		
21/XLI	12. I.	5	20	16	150,45	0.30	1,78	1,83	0.7060	2,3663	2,4327		+ Abends 14. I. 7‰ Lösung
22/XLIII	18. I.	5	20	16	155,05	0.04	1,89	1,89	0,7264	2,4379	2,4379		
23/XLV	20. I.	4	20	16	160.92	0,40	1,49	1,47	0.73632	2,3148	2,2837		
24/XLVII	22. I.	5	20	16	156,37	0,72	1,80	1,74	0,75147	2,3022	2,2255		+ Abds. 23. I. 10‰ K_2SO_4-Lösg.
25/XLIX	25. I.	4	20	16.5	162.20	0,30	1,41	1.35	0,7587	2,1732	2,0808		

2. II. 1921. Ratte im Path.-anat. Institut seziert: Präparate von Thyreoidea, Parathyreoidea, Knochen in Formol gelegt. Bericht erhalten am 2. VI. 21. Alles o. B.

*) Feines Weißbrot 5,0 g, getrocknetes Rindfleisch 0,75 g, reine Margarine 0,5 g.

Tabelle III. Blaugezeichnete Ratte.

Nummer des Versuches	Datum 1920—21	Dauer d. Versuches Stdn.	Temp. im Kasten	Zimmertemp.	Gew. der Ratte g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Verbrauch g	Respirator. Quotient	CO_2 pro kg u. Std.	O_2 pro kg u. Std.	Art der Nahrung	Bemerkungen
1/II	16. XI.	5	20	17	138,42	0,80	2,52	2,27	0,80640	3,64100	3,27992	Brot u. gezuck. kondens. Milch-H_2O font.	
2/IV	18. XI.	3	21	18	133,37	0,71	1,39	1,20	0,84144	3,4742	2,9993		
3/VI	19. XI.	$3^1/_2$	20	17	129,26	0,60	1,42	1,36	0,75847	3,1387	3,006		
4/VIII	20. XI.	6	20	16	131,82	1,20	2,58	2,45	0,76497	3,262	3,098		
5/X	22. XI.	$3^3/_4$	18	15	127,98	0,64	1,43	1,39	0,74735	2,9795	2,8963		
6/XII	24. XI.	6	19	16	128,66	1,01	2,43	2,40	0,7354	3,1479	3,109		
7/XIV	26. XI.	5	20	16,5	129,45	0,95	1,90	1,79	0,771	2,9355	2,7655		
3 Wochen lang kalkfreie Nahrung.													
8/XVI	15. XII.	5	18,5	15	102,37	0,75	2,24	2,19	0,743	2,759	2,6975	CaH-freie Nahrung + N_2O dest. *)	
9/XVIII	16. XII.	4	20	17	152,97	0,79	1,48	1,45	0,7413	3,4187	2,3698		
10/XX	17. XII.	$3^3/_4$	20	16	156,89	0,47	1,64	1,48	0,80495	2,78753	2,5156		
11/XXII	20. XII.	3	18	15	159,75	0,41	1,51	1,32	0,8310	3,158	2,755		
12/XXIV	21. XII.	3	18	15	159,35	0,53	1,35	1,26	0,77830	2,8240	2,6357		
13/XXVI	22. XII.	3	20	17	159,04	0,48	1,22	1,16	0,76383	2,5570	2,4313		
14/XXVIII	23. XII.	6	20	16	156,69	0,79	2,49	2,43	0,74435	2,6492	2,5848		Abds. 23. XII. Zusatz von 5‰ Kal-Sulfatlösung Abds. 31. XII. 10‰ Kal-Sulfatlösung Abds. 8. I. 12‰ Kal-Sulfatlösung
15/XXX	29. XII.	5	20	17	158,40	0,57	1,75	1,72	0,7391	2,210	2,1717		
16/XXXII	31. XII.	5	20	16	155,81	0,44	2,02	2,02	0,7264	2,5929	2,5929		
17/XXXIV	4. I.	5	20	16	159,14	0,40	1,83	1,84	0,72247	2,2998	2,3124		
18/XXXVI	6. I.	5	20	16	156,72	0,44	1,73	1,70	0,73925	2,2077	2,1695		
19/XXXVIII	8. I.	5	20	16	153,55	0,43	1,76	1,74	0,73477	2,2924	2,2664		
20/XL	11. I.	5	20	16	152,74	0,31	1,79	1,82	0,71445	2,3438	2,3832		Abds. 11. Jan. Zusatz von 0,04 Calc. lacticum!
21/XLII	13. I.	5	20	16	149,77	0,60	1,92	1,95	0,71525	2,564	2,604		
22/XLIV	17. I.	5	20	16,5	157,00	0,45	1,95	1,93	0,73393	2,4841	2,4586		
23/XLVI	21. I.	5	20	17	165,08	0,77	2,06	2,03	0,73715	2,4958	2,4605		
24/XLVIII	24. I.	5	20	17	161,48	0,66	1,88	1,87	0,73032	2,3285	2,3161		
25/L	26. I.	5	20	17,5	160,60	0,70	2,05	2,03	0,73357	2,5529	2,528		
26/LI	28. I.	5	20—21	17	158,72	0,70	2,03	2,02	0,73003	2,559	2,5454		
27/LII	29. I.	5	21	17	160,60	0,35	2,07	2,03	0,74074	2,5779	2,528		
Blaue Ratte vom 2. II. ab ernährt mit gewöhnl. Brot, gezuckerter Kondensmilch, getrocknetem Rindfleisch und Wasser.													
28/LIII	10. II.	5	20	18	162,00	0,69	2,13	2,11	0,7333	2,6296	2,604		
29/LIV	15. II.	5	20	17	160,00	0,65	2,15	2,14	0,7298	2,6875	2,675		
30/LV	[illegible]	5	20	17	161,00	0,70	2,19	2,17	0,7331	2,7201	2,695		

*) Feines Weißbrot, 5,0 g getrockneten Rindfleisch [illegible] Margarine 0,5 g.

Tabelle IV.

Rotgezeichnete Ratte.

Mittelwerte.

RQ = respiratorischer Quotient. CO_2 = CO_2 in g pro kg u. Stunde. O_2 = O_2 in g pro kg u. Stunde.

Vorversuche I—XIII	Versuche XV—XXVII	Versuche XXIX—IL	Gesamtabnahme geg. d. Vorversuche
RQ = 0,76910110	0,7665186	0,73327	— 0,0357410
CO_2 = 3,0544766	2,917061	2,4477	— 0,6067766
O_2 = 2,8528066	2,766571	2,4265	— 0,4263066

Blaugezeichnete Ratte.

Vorversuche II—XIV	Versuche XVI—XXVIII	Versuche XXX—XL	Gesamtabnahme geg. d. Vorversuche
RQ = 0,775004	0,77239	0,729407	— 0,045597
CO_2 = 3,2255428	2,736204	2,32443	— 0,9011128
O_2 = 3,022003	2,569957	2,31601	— 0,705993

Versuche XLII—LII (Calcium lactic..Zusatz) { RQ = 0,73157; CO_2 = 2,508886; O_2 = 2,49153

Versuche LIII—LV (normale Nahrung) { RQ = 0,73206; CO_2 = 2,67916; O_2 = 2,658

IV. Ergebnisse der Untersuchung.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen, die an zwei für derartige Versuche besonders geeigneten Tieren angestellt wurden, lassen sich kurz mitteilen, da ich alles wesentliche in zwei, alle Einzelheiten enthaltenden Tabellen und in einer zusammenfassenden Generaltabelle niedergelegt habe.

Tabelle II. (Rotgezeichnete Ratte.)
Tabelle III. (Blaugezeichnete Ratte.)
Tabelle IV. (Zusammenfassende Generaltabelle: Mittelwerte.)

Ehe ich auf die stoffwechselphysiologisch interessanten Tatsachen eingehe, sind ein paar Bemerkungen über das allgemeine Verhalten der Tiere während der Stoffwechselversuche zu machen.

Die Tiere verhielten sich während der ganzen Versuchsdauer in der Respirationskammer sehr ruhig; da alle Versuche nach 18stündigem Hunger angestellt wurden, geben die erhaltenen Werte tatsächlich den ungestörten Grundumsatz wieder. Eine gewisse Änderung der Tiere ließ sich erst nach längerdauernder Ernährung mit calciumarmer Nahrung beobachten; besonders in der Zeit, wo sie gleichzeitig Kalium erhielten. Die Tiere waren

im allgemeinen lebhafter, eine Beobachtung, welche während ihres Aufenthaltes in ihren Käfigen außerhalb der Respirationskammer gemacht werden konnte.

In der Respirationskammer ließ sich bemerken, daß die Tiere viel mehr Flüssigkeit von sich gaben.

Der Wassergehalt in der Kammer war größer als in anderen Versuchen.

Diese Beobachtungen lassen sich am leichtesten deuten als Steigerung der Erregbarkeit der Tiere und insofern würden meine Versuche einen neuen Beitrag zu der behaupteten Erregbarkeitssteigerung infolge Calciummangel liefern. Die Erregbarkeitssteigerung würde sowohl die Muskulatur als auch autonome Gewebe betreffen. Wenn man aber auf Grund dieser Beobachtungen gewisse Erwartungen auf das Verhalten des Stoffwechsels knüpfen würde, so werden diese Erwartungen durch den tatsächlichen Ausfall meiner Versuche enttäuscht.

In der Vorperiode zeigt sich bei beiden Versuchstieren annähernd das gleiche Verhalten. Bei dem einen Tiere betrug die CO_2-Ausscheidung pro kg und Stunde 3,05, bei dem andern 3,23 g, der Sauerstoffverbrauch 2,85 bzw. 3,02 g. Im Verlaufe der längerdauernden Periode der calciumarmen Ernährung unter Zuhilfenahme der biologischen Entwertung des Calciums durch das Kalium trat nun eine fortschreitende Verminderung des Grundumsatzes auf. Bei dem einen Tier (rotgezeichnete Ratte) sank die CO_2-Ausscheidung von 3,05 auf 2,45 g, bei der blaugezeichneten Ratte von 3,23 auf 2,33 g, der Sauerstoffverbrauch auf 2,43 bzw. 2,32 g pro kg Körpergewicht und Stunde. (Siehe Tabelle V.)

Es handelt sich also um eine ganz merkliche Abnahme in der Größe des respiratorischen Grundumsatzes. Es sind Größenwerte, wie sie etwa dem entsprechen, wie sie im Zustande der Unterwertigkeit der Schilddrüse oder der Hypophyse zur Beobachtung gelangen.

Ich bemerke, daß die Unterschiede in der Vor- und der Versuchsperiode viel größer sind als etwa individuelle Unterschiede, wie sie zwei verschiedene Tiere unter sonst gleichen Bedingungen zeigen können. Ferner handelt es sich in meinen Versuchen um eine Veränderung in den quantitativen Verhältnissen des Grundumsatzes, nicht aber um solche qualitativer Art. Dafür sprechen die Zahlenwerte des respiratorischen Quotienten. In der Vorperiode betrug derselbe 0,77 bzw. 0,78, in der eigentlichen Versuchsperiode 0,73 bzw. 0,73. Diese Unterschiede dieser Vor- und Versuchsperiode sind so außerordentlich klein, daß man nicht mit der Behauptung fehlgehen wird, daß der Anteil von Eiweiß, Fett und Kohlenhydraten am Stoffwechsel in beiden Perioden der gleiche geblieben sei.

Wie ich schon oben erwähnt habe, wurde bei dem zweiten Tiere (blaugezeichnete Ratte) zum Schluß der Nahrung Calcium in Form von Calcium lacticum zugesetzt und schließlich eine normale, das Calcium in den nötigen Mengen enthaltend, gegeben.

Der Erfolg war, daß der Grundumsatz wieder in die Höhe ging, allerdings erst nach längerer Zeit, und es wurden auch nicht in der mir zur Verfügung stehenden Zeit die ursprünglichen Werte wieder erreicht. Schließlich ist noch anzuführen, daß das Körpergewicht der Tiere während der ganzen Versuchszeit die Tendenz hatte, etwas in die Höhe zu gehen; allerdings handelte es sich um nur kleine Beträge. Diese Tatsache spricht, meiner Meinung nach, entscheidend dafür, daß die von mir gewählte Nahrung in jeder Beziehung bis auf den Calciummangel eine zureichende war; andererseits sind die Zunahmen des Körpergewichtes von einem so kleinen Betrage, daß auf diese die Minderung des Grundumsatzes nicht zurückgeführt werden kann. Auch von den Temperaturverhältnissen während meiner Versuche sind die Ergebnisse nicht abhängig. Bekanntlich treten bei Verminderung der Außentemperatur Erhöhungen des Grundumsatzes auf. Während meiner Versuche war zeitweilig, wegen ungenügender Heizung, die Temperatur des Versuchsraumes niedriger als in der Vorperiode; dieser Umstand hinderte aber nicht, daß unter dem Einfluß des Calciummangels der Grundumsatz sich weiter senkte.

Als Hauptergebnis meiner Untersuchungsreihen muß die Minderung des Grundumsatzes bezeichnet werden.

Diese Tatsache ist so klar, daß sie jede Möglichkeit ausschließt, dem Calciummangel, wie er durch Entzug des Calciums in der Nahrung herbeigeführt werden kann, einen fördernden Einfluß auf den Stoffwechsel zuzuschreiben. Will man daran festhalten, daß die nervöse Erregbarkeit durch Calciummangel gesteigert wird (Andeutungen, die hierauf hinzuweisen scheinen, habe ich selbst beobachtet und oben beschrieben), so hat doch diese Erregbarkeitssteigerung laut Aussage meiner Versuche keinen Einfluß auf den respiratorischen Stoffwechsel.

Man könnte natürlich Hilfshypothesen ersinnen, um den Widerspruch zwischen nervöser Erregbarkeitssteigerung infolge Calciummangel und Stoffwechselverminderung in Einklang zu bringen, doch verzichte ich auf eine Mitteilung solcher Hilfs-

hypothesen, weil eine experimentelle Prüfung derselben außerhalb des Rahmens meiner Arbeit liegt.

Die Verminderung des Stoffwechsels ist etwa von der gleichen Größenordnung wie diejenige nach Entfernung der Schilddrüse. Wir sehen demnach, daß zwei anscheinend verschiedene Eingriffe, namentlich der Wegfall eines inneren Sekretes und der Mangel an einem Mineralbestandteil der Nahrung, symptomatisch nach dem Stoffwechsel beurteilt, zu dem gleichen Bilde führen kann.

Der Gedanke, daß die Brücken, welche zwischen der Lehre von der inneren Sekretion und der Lehre von dem Einfluß von Ionen auf den funktionellen Zustand des Organismus vorhanden sind, einer Berücksichtigung wohl wert sind, gewinnt aus Ergebnissen, wie sie meine Versuche gezeigt haben, eine Bedeutung. Man könnte sogar daran denken, ob nicht Calciummangel in der Nahrung im ungünstigen Sinne gewisse Drüsen mit innerer Sekretion beeinflußt, diese vielleicht früher als irgendwelche andere Organe in dem Körper. Am ersten wird man natürlich an die Schilddrüse denken. Deswegen habe ich, als bei dem einen Tiere der Stoffwechsel seinen Tiefstand erreicht hatte, die Sektion ausgeführt. Herr Professor Dr. Wegelin, Direktor des Bernischen Pathologisch-anatomischen Instituts, hatte die große Güte, folgenden Sektionsbefund mir mitzuteilen:

„Die in Serienschnitten untersuchte Schilddrüse zeigt ganz normales Bild; ebenso die Epithelkörperchen.

Die Knochen sind sehr hart und lassen sich ohne Entkalkung nicht schneiden.

An den Extremitätenknochen sind die Epiphysenlinien noch vorhanden, zeigen normale Beschaffenheit, ebenso zeigen die Gelenkknorpel und der periostal gebildete Knochen nichts besonderes.“

Aus dem Berichte ergibt sich, daß weder an der Thyreoidea noch an der Parathyreoidea irgendeine morphologisch konstatierbare Veränderung vorhanden war.

Auch der Knochen erwies sich bei der mikroskopischen Untersuchung als normal. Leider habe ich versäumt, bei der Sektion die Hypophyse zu entnehmen, so daß ich darüber keine Angabe machen kann. Insofern die Tiere während der Versuchsperiode eine geringe Körpergewichtszunahme aufwiesen, könnte man an eine Insuffizienz der Hypophyse denken. Doch ist diese vorläufig eine reine Hypothese!

Eine andere Annahme, die gemacht werden kann, ist die einer kompensatorischen Abnahme des Stoffwechsels im Hinblick auf die erhöhte Nervenerregbarkeit infolge des Calciummangels. Es lassen sich hier nur Probleme aufstellen, keine Lösungen bringen. Es bleibt aber als bedeutsame Tatsache, unabhängig von jeder Erklärung bestehen, daß eine calciumarme, somit aber in jeder Beziehung zureichende Ernährung den Grundumsatz erheblich vermindern kann.

Zusammengefaßt

ist der wesentliche Inhalt meiner Arbeit der nachfolgende:

1. Es wurde Ratten eine calciumarme Nahrung gegeben und das im Körper vorhandene Calcium durch Kalium biologisch zu entwerten versucht; im übrigen aber war die Nahrung in jeder Beziehung eine zureichende.

2. An so ernährten Tieren wurden respiratorische Stoffwechselversuche angestellt, deren Ergebnis war, daß der Grundumsatz unter dem Einfluß des Calciummangels sich erheblich verminderte.

3. Die histologische Untersuchung ergab keine erkennbare Veränderung an Thyreoidea, Parathyreoidea und Knochen.

Literatur.

Tiegerstedt, Handbuch der physiolog. Methodik. — Haldane, J., A new form of Apparatus for measuring the Respiratory Exchange of Animals. (Journ. of Physiol **12**, 419.) — Danoff, N., diese Zeitschr. 1919, Sonderabdruck aus Bd. 93, H. 1 u. 2. — Frey, v., Physiologie. Vorlesungen. Springer, Berlin. — Hofmeister, Frz., Über qualitativ unzureichende Ernährung. Asher und Spiros Ergebn. 1916. — Mohr, Die Methodik der Stoffwechseluntersuchungen. — Koenig, J., Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genußmittel. Berlin 1904. — Albu und Neuberg, Physiologie und Pathologie des Mineralstoffwechsels. Springer, Berlin. — The Laboratory of physiological Chemistry 1917/18 (Sheffield Scientific School Yale University). Studies in Ca- und Mg-Metabolism. I. The effects of Base and Acids. By M. H. Givens and Lafayette B. Mendel 1917. (From the Journ. of biol. chem. 1917/18.) — Idem II. The effects of Diets Poor in Calcium. By Id. 1917. The Influence of the administration of Ca spon Blood Sugar Content in Rabbits with Guanidine Hypoglycaemia. By C. K. Watanabe 1918. (From the Journ. of physiol. chem. 1918.) The Change of Phosphate and Calcium Content in Serum in Guanidine Tetany and the Relation between the Ca Content and Sugar in the Blood. By Idem 1918.

Ein Beitrag zur Permeabilität des Pflanzenplasmas für die Neutralsalze.

IV. Mitteilung.

Von

Hugo Kahho (Dorpat, Estland).

(Eingegangen am 26. Juli 1921.)

Ich habe früher[1]) gezeigt, daß die Giftwirkung der Neutralsalze auf das Pflanzenplasma der lyotropen Reihenfolge $SO_4 \rightarrow CNS$ nach zunimmt, wobei die Alkalisalze eine viel größere Aktivität besitzen als die Erdalkalien.

In den vorliegenden Versuchen wird über die Permeabilitätsverhältnisse der Neutralsalze mit Bezugnahme auf die Giftwirkung berichtet.

Methodisches.

Die Versuche wurden an jungen Wurzeln der gelben Lupine ausgeführt.

Die von Haage und Schmidt (Erfurt) bezogenen Samen wurden 24—48 Stunden in destilliertem Wasser eingequollen und nachher in feuchten Sägespänen gezogen.

Zu den Versuchen wurden 25—40 mm lange Hauptwurzeln verwendet. Vor dem Versuch wurden die Wurzeln 30 Min. in destilliertes Wasser gelegt.

Zur Permeabilitätsbestimmung wurde Lundegårdhs[2]) Gewebespannungsmethode angewandt.

Eine abgeschnittene Wurzelspitze (ca. 1,0—1,5 cm), auf welcher 2 Marken mit Kienruß (bzw. Tusche) angebracht sind — die eine gleich an der Spitze, die andere in der Entfernung von etwa 6 mm von der ersteren —, wird mittels einer dünnen Glasnadel in einer Schale in Wasser an einen Paraffinblock so befestigt, daß das freie Ende der Wurzel auf einer Paraffinunterlage liegt. Später, im Laufe der Arbeit, empfahl es sich, um die Wurzel streng in horizontaler Lage zu erhalten, statt der zweiten Paraffinstütze neben dem Paraffinblock eine gleichhohe Glasplatte daneben zu legen,

---

[1]) Diese Zeitschr. **120**, 125, 1921; II. Mitt.

[2]) K. Svenska Vet. Akad. Handl. **47**, Nr. 3. 1911; vgl. Stålfeldt, ebenda **62**, Nr. 1, S. 78. 1921; Delf, Ann. of Botany **30**, 283. 1916.

auf welcher der Spitzenteil der Wurzel ruhte. Der Abstand zwischen den Marken wurde zuerst in Wasser wiederholt gemessen und dann das Wasser mit einer schwach hypertonischen Salzlösung vertauscht.

Die Messungen wurden mittels eines Okularmikrometers — Okular II, Objektiv 1, Leitz — ausgeführt. Es sei hier beispielsweise eine Messung vorgeführt. Eine Wurzelspitze in KCl 0,22 Mol zeigte folgende Werte in Mikrometerstrichen:

Zeit in Minuten	0	3	6	8	32	60
Mikrometerstriche	135	126	120	120	123	125

Verkürzung — $K = 11{,}11\%$; Ausdehnung — $D = 3{,}70\%$.

Der Abstand zwischen den Marken auf der Wurzel beträgt ursprünglich in Wasser 135 Mikrometerstriche. In KCl-Lösung tritt eine Verkürzung ein, die nach 6 Minuten das Maximum erreicht (15 Mikrometerstriche $= 11{,}11\%$). Nach 8 Minuten beginnt die Wiederausdehnung, die nach 60 Minuten vom Beginn des Versuches 5 Mikrometerstriche ($= 3{,}70\%$ der beobachteten Länge) erlangt.

Es ist begreiflich, daß je größer die Hypertonie einer Lösung ist, desto länger die Zeit zwischen dem Moment, wo die maximale Verkürzung erreicht wird und dem Beginn der Wiederausdehnung wird. In stark hypertonischen Lösungen wird das Plasma von der Zellwand völlig abgehoben, was äußerlich dadurch in Erscheinung tritt, daß die Länge der markierten Stelle der Wurzel nach der maximalen Verkürzung lange Zeit unverändert bleibt. Infolgedessen sind bei diesen Versuchen nur schwach hypertonische Lösungen angewandt, d. h. solche, bei denen die erwähnte Zwischenzeit nur wenige Minuten dauert und der Plasmaschlauch vermutlich von der Zellwand nicht abgehoben[1]) und die organische Verbindung der Plasmaoberflächenschichten mit der Zellwand nicht zerstört wird[2]). Ferner ist es von großer Wichtigkeit, den Wendepunkt von der Kontraktion zur Expansion der Wurzeln exakt zu bestimmen. Dazu wurden die Versuchsobjekte stets solange kontinuierlich beobachtet, bis dieser Punkt erreicht war, und danach wurden die Messungen in größeren Zeitabschnitten (5 bis 10 Minuten) gemacht, da die Wiederausdehnung der Wurzeln ziemlich gleichmäßig vor sich ging.

Bei allen Versuchen sind isotonische Lösungen der Salze (Merck, pro Analysi; Lösungen volumnormal) angewandt.

Für die Mehrzahl der Salze wurden die isotonischen Lösungen nach den Fittingschen Koeffizienten berechnet[3]). Für NaJ und NaBr wurde der isotonische Koeffizient dem des $NaNO_3$ gleich angenommen.

Da reine Neutralsalzlösungen mehr oder weniger giftig sind, so habe ich die Versuche nur eine Stunde dauern lassen und nach der Beendigung eines jeden Versuches die Wurzeln auf die Ausdehnungsfähigkeit in Wasser geprüft, um sicher zu sein, daß die Zellen noch lebend waren.

---

[1]) Vgl. Lundegårdh, l. c. S. 120.

[2]) Vgl. Hansteen-Cranner, Ber. d. Dtsch. Bot. Ges. **37**, 380. 1919.

[3]) Jahrb. f. wiss. Botan. **57**, 553. 1917.

Bei der näheren Untersuchung zeigte sich, daß gewisse äußere Bedingungen schon bei der Aufzucht der Wurzeln einen viel größeren Einfluß auf die Permeabilität derselben ausüben als man hätte erwarten können. Eine etwas zu große oder zu geringe Feuchtigkeit der Sägespäne, Schwankungen in Temperatur usw. setzen die Durchlässigkeit erheblich herab. Infolgedessen stammen die zum Vergleich genommenen Keimlinge immer aus derselben Kultur. Da nun ferner die äußeren Bedingungen, wie die Temperatur und Belichtung, während der Arbeit im Laboratorium beträchtlich schwankten, so sind die Ergebnisse der Versuche nur innerhalb der Grenzen einer jeden Serie, wo diese Bedingungen relativ gleich waren, vergleichbar.

Da uns hier hauptsächlich die Wiederausdehnungen der Wurzeln in verschiedenen Salzlösungen interessieren, so ist für die vorhergehenden Verkürzungen (K) derselben der Mittelwert der Prozente aus allen Verkürzungen einer jeden Versuchsserie angeführt. In den Tabellen ist dieser Mittelwert durch M.K. bezeichnet. Die übrigen Zahlen der Tabellen sind 1. die Wiederausdehnungen der Wurzelspitzen (D) im Laufe einer Stunde (vom Beginn des Versuches an gemessen) in Prozenten der beobachteten Länge ausgedrückt, 2. das Verhältnis (E) der Wiederausdehnungen zur vorhergehenden Verkürzung $\frac{100\,D}{K} = E$.

Die Beeinflussung der Permeabilität durch Anionen.

a) Natriumsalze.

Tabelle I.

Salz	Konzentration in Mol	I. Serie M.K. = 6,8% D %	I. Serie E %	II. Serie M.K. = 5,7% D %	II. Serie E %	Konzentration in Mol.	III. Serie M.K. = 9,7% D %	III. Serie E %
NaBr	0,15	4,2	51	4,6	49	0,18	6,1	66
NaJ	0,15	2,2	43	1,5	32	0,18	5,1	43
$NaNO_3$	0,15	2,2	41	—	—	0,18	5,4	50
NaCl	0,15	2,1	27	1,4	38	0,18	3,6	29
Na-Tartrat	0,118	0	0	0,7	19	0,141	1,5	24
Na_2SO_4	0,113	0	0	0,7	15	0,135	0,7	19
Temperatur C°		20—21°		20°			20—22°	

Salz	Konzentration in Mol.	IV. Serie M.K. = 7,8% D %	IV. Serie E %	Konzentration in Mol.	V. Serie M.K. = 10,5% D %	V. Serie E %	VI. Serie M.K. = 9,1% D %	VI. Serie E %
NaBr	0,18	4,0	42	0,20	3,6	30	5,0	70
NaJ	0,18	4,3	65	0,20	5,8	45	4,7	39
$NaNO_3$	0,18	3,0	28	0,20	2,1	25	1,9	27
NaCl	0,18	2,2	20	0,20	3,3	33	3,0	30
Na-Tartrat	0,141	1,5	25	0,157	0,8	14	0	0
Na_2SO_4	0,135	0,7	16	0,150	0	0	0	0
Temperatur C°		24°			23—25°		24°	

Nach den Daten der Tabelle I nimmt die Salzaufnahmegeschwindigkeit von Plasma nach folgenden Reihenfolgen ab:

I. und II. Serie — Br > J, NO_3 > Cl > Tartrat, SO_4.
III. „ — Br > NO_3 > J > Cl > Tartrat > SO_4.
IV. „ — J > Br > NO_3 > Cl > Tartrat > SO_4.
V. „ — J > Br > Cl > NO_3 > Tartrat > SO_4.
VI. „ — Br > J > Cl > NO_3 > Tartrat, SO_4.

Einige Versuche mit Na-Citrat zeigten, daß es ebenso schwer permeiert, als das Sulfat.

Wie man aus dieser Gegenüberstellung sieht, haben alle Reihenfolgen ungefähr denselben lyotropen Charakter. Viele andere derartige Versuche ergaben etwa dieselben Resultate. Die Wiederausdehnung der Wurzeln ist in den Lösungen von Jodid und Bromid bzw. auch Nitrat stets schneller als in der NaCl; in den Lösungen der Na-Salze mit den mehrwertigen Anionen ist sie mit dieser Methode kaum nachzuweisen.

Den nicht völlig übereinstimmenden Stellungen der ersten drei Anionen (J, Br, NO_3) in den Reihenfolgen ist kein großer Wert beizulegen, denn bei diesen gutpermeierenden Salzen wird die Eindringungsfähigkeit sehr leicht von verschiedenen Faktoren, die sich nicht übersehen lassen, beeinflußt.

Ferner ist zu bemerken, daß die Unterschiede in der Aufnahmegeschwindigkeit bei den Na-Salzen besser hervortreten als bei den K-Salzen.

b) Kaliumsalze.

Die vier ersten in der Tabelle II angeführten Salze zeigen durchschnittlich eine ziemlich gleiche Durchdringungsfähigkeit. Doch bei einigen Versuchen macht sich die geringere Permeabilität für KCl bemerkbar. Das K-Citrat verhält sich etwa wie das Sulfat.

Im allgemeinen läßt sich für die Kaliumsalze diese Permeabilitätsreihenfolge aufstellen: — Br, NO_3 > Cl > Tartrat > SO_4, Citrat. Sie ist ungefähr dieselbe, wie bei den Natriumsalzen. Wie bekannt, sind zuerst von Troendle[1]) für die Plasmapermeabilität für Neutralsalze folgende Ionenreihen aufgestellt worden. Anionen: — SO_4 < Cl < NO_3 und Cl < Br, J. Kationen: — Ca < Sr < Ba < Mg < Li < Na < K < Rb.

---

[1]) A. Troendle, Arch. de sciences phys. et nat. **45**, 125. 1918.

Tabelle II.

Salz	Konzentration in Mol.	I. Serie M.K. = 3,9%		II. Serie M.K. = 4,4%		Konzentration in Mol.	III. Serie M.K. = 6,2%	
		D %	E %	D %	E %		D %	E %
KBr	0,160	2,3	74	3,7	64	0,180	4,8	55
KNO_3 . . .	0,165	2,0	67	3,2	55	0,185	5,5	77
KCl	0,161	1,8	21	2,1	42	0,181	4,8	54
K-Tartrat . .	0,127	0,8	25	0	0	0,143	0	0
K_2SO_4 . . .	0,123	0	0	0	0	0,138	0	0
K-Citrat . .	0,101	0	0	—	—	0,114	0	0
Temperatur C°		20—21°		20°			19—20°	

Salz	Konzentration in Mol.	IV. Serie M.K. = 7,0%		Konzentration in Mol.	V. Serie M.K. = 9,1%	
		D %	E %		D %	E %
KBr	0,180	5,2	62	0,200	4,6	43
KNO_3 . . .	0,185	3,7	55	0,206	4,4	40
KCl	0,181	5,0	58	0,201	4,3	35
K-Tartrat . .	0,143	1,5	28	0,159	1,1	20
K_2SO_4 . . .	0,138	0	0	0,153	0	0
K-Citrat . .	0,114	0	0	0,126	0	0
Temperatur C°		18—19°			19—20°	

Die Beeinflussung der Permeabilität durch Kationen.

Wie aus der Tabelle III hervorgeht, ist die Aufnahme der Erdalkalien so gering, daß sie mit dieser Methode gar nicht nachzuweisen ist[1]). Die Ausdehnung der Wurzeln bleibt nach der Kontraktion aus, nur für das Magnesiumchlorid ist in einigen Versuchen eine geringe Expansion zu konstatieren.

Tabelle III.

Salz	Konzentration in Mol.	I. Serie M.K. = 9,6%		II. Serie M.K. = 9,5%	
		D %	E %	D %	E %
KCl	0,190	5,7	68	5,8	60
NaCl	0,193	3,9	83	4,3	40
$MgCl_2$ . . .	0,133	0	0	0	0
$BaCl_2$. . . .	0,138	0	0	0	0
$CaCl_2$. . . .	0,134	0	0	0	0
Temperatur C°		18°		18—19°	

[1]) Vgl. Fitting, Jahrb. f. wiss. Botan. **56**, 1. 1915.

Tabelle III (Fortsetzung).

Salz	Konzentration in Mol.	III. Serie M. K. = 7,9% D %	III. Serie M. K. = 7,9% E %	IV. Serie M. K. = 8,4% D %	IV. Serie M. K. = 8,4% E %
KCl	0,210	3,1	44	3,4	38
NaCl	0,214	2,1	28	1,7	24
LiCl	0,204	1,3	23	0,9	13
$MgCl_2$ . . .	0,148	0,9	8	0,9	8
$BaCl_2$. . . .	0,152	0	0	0	0
$SrCl_2$. . . .	0,149	0	0	0	0
Temperatur C°		20—21°		21°	

Nach abnehmender Eindringungsfähigkeit geordnet, haben wir hier folgende Kationenreihe: —K > Na > Li > Mg > Ba, Ca. Die Permeabilitätsbeschaffenheit der letzteren zwei Erdalkalikationen werden wir später in Salzgemischen näher kennen lernen.

Gegenseitige Beeinflussung der Aufnahmegeschwindigkeit durch Salze.

a) Kationen.

Untersuchen wir zunächst die Beeinflussung der KNO_3-Aufnahme durch Erdalkalikationen.

Tabelle IV.

Salz (Konzentration in Mol.)	I. Serie M. K. = 9,6% D %	I. Serie M. K. = 9,6% E %	II. Serie M. K. = 8,1% D %	II. Serie M. K. = 8,1% E %
KNO_3 0,18	4,4	47	4,8	85
KNO_3 0,15 + $MgCl_2$ 0,020 . .	3,6	31	4,0	53
KNO_3 0,15 + $BaCl_2$ 0,021 . . .	1,6	20	0,8	7
KNO_3 0,15 + $CaCl_2$ 0.020 . . .	0	0	0	0
Temperatur C°	19°		19—20°	

Salz (Konzentration in Mol.)	III. Serie M. K. = 10,9% D %	III. Serie M. K. = 10,9% E %	IV. Serie M. K. = 10,1% D %	IV. Serie M. K. = 10,1% E %
KNO_3 0,23	4,8	42	5,6	52
KNO_3 0,202 + $MgCl_3$ 0,019 . .	3,7	41	4,4	40
KNO_3 0,202 + $BaCl_2$ 0,020 . .	1,8	15	1,9	18
KNO_3 0,202 + $CaCl_2$ 0,019 . .	0	0	0	0
Temperatur C°	20°		20°	

Wie aus der Tabelle IV ersichtlich ist, wird die Eindringungsfähigkeit des Salpeters in ausgedehntem Maße von den Erdalkalikationen beeinflußt. Alle Erdalkalien hemmen mehr oder weniger die Aufnahme von KNO_3.

Dieselben Resultate ergaben die Versuche mit KCl + Erdalkalien.

Bemerkenswert ist hier die Tatsache, daß die Hemmungsfähigkeit der zweiwertigen Kationen im umgekehrten Verhältnisse zur Permeabilität für diese Salze steht.

Von den angeführten Erdalkalien dringt das Magnesiumchlorid selbst am besten in das Plasma ein und setzt demgemäß im Vergleich mit Barium und Calcium die Durchlässigkeit für KNO_3 am wenigsten herab. Dagegen hemmt ein kleiner Zusatz von $CaCl_2$ die Aufnahme von Salpeter sehr beträchtlich. Etwas weniger hemmend als $CaCl_2$ wirkt das Bariumchlorid. Aus der letzteren Tatsache läßt sich eine relativ größere Eindringungsfähigkeit des $BaCl_2$ im Vergleich mit der des $CaCl_2$ ableiten.

Es ist klar, daß diese aufnahmehemmende Wirkung der Erdalkalien der sog. „entgiftenden Wirkung" dieser Salze direkt proportional ist.

Aber auch die Alkalisalze können die Aufnahmegeschwindigkeit gegenseitig beeinflussen, wie das aus der folgenden Tabelle V zu ersehen ist.

Tabelle V.

Salz (Konzentration in Mol.)	I. Serie M. K. = 5,5%		II. Serie M. K. = 5,8%	
	D %	E %	D %	E %
KNO_3 0,20	4,1	77	3,9	67
LiCl 0,19.	1,5	18	1,0	16
KNO_3 0,17 + LiCl 0,028	1,9	42	1,8	32
LiCl 0,17 + KNO_3 0,021	1,9	31	—	
Temperatur C°	20°		20°	

Salz (Konzentration in Mol.)	III. Serie M. K. = 6,9%		IV. Serie M. K. = 6,1%	
	D %	E %	D %	E %
KNO_3 0,20	3,0	44	3,2	44
LiCl 0,19	0,9	20	0,4	8
KNO_3 0.17 + LiCl 0,028	2,6	37	1,1	21
LiCl 0.17 + KNO_3 0,021	1,2	13	0,7	14
Temperatur C°	19—20°		16—18°	

Tabelle V (Fortsetzung).

Salz (Konzentration in Mol.)	V. Serie M. K. = 4,2% D %	E %	VI. Serie M. K. = 5,8% D %	E %
KCl 0,200	3,5	65	4,0	60
LiCl 0,192	1,4	38	1,9	41
KCl 0,15 + LiCl 0,048 .	1,6	48	2,6	53
LiCl 0,15 + KCl 0,043 .	1,9	49	2,3	50
Temperatur C°	17—19°		18°	

Nach den Daten der Tabelle V setzt ein Zusatz von LiCl zu KNO_3 bzw. KCl die Permeabilität des Plasmas für diese Salze immer mehr oder minder herab. Dagegen haben umgekehrt dieselben Mengen von KNO_3 bzw. KCl keinen hemmenden Einfluß auf die Aufnahme von Lithiumchlorid, ja in einigen Fällen sogar scheinen sie den Durchtritt von LiCl zu fördern.

Auf Grund des Gesagten kommt auch dem Lithium eine „entgiftende Wirkung" in bezug auf andere Alkalisalze zu.

Zusammenfassend läßt sich über die gegenseitige Beeinflussung der Aufnahmegeschwindigkeit durch die Kationen folgende Regel aufstellen:

Ein jedes Kation der Permeabilitätsreihe: K > Na > Li > Mg > Ba > Ca wird von den von ihm rechtsstehenden Kationen bei der Aufnahme gehemmt, und um so mehr, je weiter das Kation rechts steht. Die zweiwertigen Kationen haben gemäß ihrer größeren Kolloidaktivität eine bedeutend größere Hemmungskraft.

b) Anionen.

Bei den aufnahmehemmenden Wirkungen der Kationen, haben wir die Rolle des Anions nicht in Betracht gezogen. Die Anionen waren hier so gewählt, daß sie mit dem betreffenden Kation etwa gleich permeable Salze bilden, wie z. B. KNO_3 und KCl, deren Anionen in den Permeabilitätsreihenfolgen fast immer nebeneinander stehen. Kombinieren wir aber Salze mit den weitstehenden Anionen in der Permeabilitätsreihe, so können sie gegenseitig die Aufnahmegeschwindigkeit mehr oder minder stark beeinflussen, wie das aus der Tabelle IV zu ersehen ist.

Hier ist als Hauptsalz KCl gewählt (siehe Tabelle VI), das ungefähr in der Mitte der Permeabilitätsreihe J > Br > NO_3 > C

Tabelle VI.

Salz (Konzentration in Mol.)	I. Serie M.K. = 10,5% D %	I. Serie M.K. = 10,5% E %	II. Serie M.K. = 10,8% D %	II. Serie M.K. = 10,8% E %
0,20 KCl + 0,0200 KJ	5,9	57	6,0	54
0,20 KCl + 0,0205 KNO_3 . .	4,9	44	5,6	52
0,22 KCl (Kontrollversuch) . .	**4,1**	**41**	**4,4**	**46**
0,20 KCl + 0,0153 K_2SO_4 . .	3,8	35	3,9	35
0,20 KCl + 0,0126 K-citrat . .	0,8	6	1,4	10
Temperatur C°	19–20°		20°	

Salz (Konzentration in Mol.)	III. Serie M.K. = 8,8% D %	III. Serie M.K. = 8,8% E %	IV. Serie M.K. = 9,9% D %	IV. Serie M.K. = 9,9% E %
0,20 KCl + 0,0200 KBr . . .	6,5	72	4,7	46
0,22 KCl (Kontrollversuch) . .	**3,8**	**55**	**3,7**	**33**
0,20 KCl + 0,0153 K_2SO_4 . .	2,9	31	1,6	20
0,20 KCl + 0,0126 K-Citrat . .	2,7	23	1,6	18
Temperatur C°	20°		20°	

Tartrat > SO_4 > Citrat steht, und zu ihm sind Kalisalze mit den links- und rechtsstehenden Anionen in isotonischen Mengen zugefügt. Wie das aus den Daten der Tabelle VI folgt, wird die Aufnahme von KCl von den rechtsstehenden Anionen — Sulfat und Citrat — etwas gehemmt, während ein Zusatz von Salzen mit den linksstehenden Anionen (J, Br, NO_3) die Aufnahme ganz deutlich fördert und um so besser, je weiter das Anion links steht. Der Durchtritt der Salze durch das Plasma wird von Anionen nach derselben Regel beeinflußt, wie das bei den Kationen der Fall ist.

Dieselben Beziehungen haben wir auch bei den Salzen mit verschiedenen Kationen.

Die Tabelle VII zeigt, daß die Aufnahme von Natriumsulfat und -chlorid durch einen Zusatz von KBr gefördert wird, während ein Zusatz von Na_2SO_4 zur überwiegenden Menge des Kaliumbromids die Permeabilität des Plasmas für das letztere Salz herabsetzt.

Wie schon oben erwähnt, wurden die Wurzeln nach jedem Versuch auf die Wiederausdehnung in Wasser geprüft. In den

Tabelle VII.

Salz (Konzentration in Mol.)	I. Serie M.K. = 8,8% D %	I. Serie M.K. = 8,8% E %	II. Serie M.K. = 7,2% D %	II. Serie M.K. = 7,2% E %
0,20 KBr	4,1	40	4,1	45
0,154 Na_2SO_4	0	0	0	0
0,125 Na_2SO_4 + 0,037 KBr . .	3,2	31	1,3	17
0,16 KBr + 0,030 Na_2SO_4 . .	2,6	28	1,7	23
0,20 NaCl	3,2	45	2,8	47
0,17 NaCl + 0,029 KBr . . .	4,1	51	3,5	56
Temperatur C°	20—22°		20°	

meisten Fällen erreichten sie ihre ursprüngliche Länge, und besonders nach der Behandlung mit langsam permeierenden Salzen wie die Sulfate, Tartrate, Citrate, $CaCl_2$ und $BaCl_2$. Nach Aufenthalt in Lösungen von Jodiden, Bromiden, zuweilen auch von Nitraten und Chloriden der Alkalisalze, ferner in $MgCl_2$-Lösung blieben die Wurzeln nach Wiederausdehnung in Wasser um 1—2 Mikrometerstriche hinter der ursprünglichen Länge zurück. Diese Salze, insbesondere die Jodide und Bromide, sind wegen ihrer leichten Eindringungsfähigkeit sehr giftig, wie wir das schon früher gezeigt haben[1]). Die nachherige Deplasmolyse in Wasser bringt das geschädigte Plasma in einigen Zellen zu einer irreversiblen Zusammenschrumpfung, die die Ursache der unvollständigen Ausdehnung ist.

Besprechung der Resultate.

Diese Versuche haben einen weiteren Beweis für die Annahme gebracht, daß die Giftwirkung der Neutralsalze im engsten Zusammenhange mit der Fähigkeit dieser Salze in das Plasma einzudringen steht. Das geht ohne weiteres aus den gleichen Reihenfolgen der Anionen und Kationen hervor, die bei der Koagulation des Plasmas durch Salze und bei den Permeabilitätsversuchen auftreten. Die Giftigkeit der Salze nimmt parallel der Permeabilität nach der lyotropen Anionenreihe $SO_4 < \ldots Br < J$ zu[1]). Für die Kationen gilt die Reihe: — Erdalkalien < Na < K. Alle Faktoren, die die Permeabilität für die Neutralsalze fördern, wirken auch gleichzeitig die Giftigkeit steigernd und umgekehrt, entgiftende Agenzien und Faktoren setzen im allgemeinen, mit

[1]) l. c.

Ausnahme einiger, die später erörtert werden, immer die Durchlässigkeit des Plasmas für die giftigen Salze herab[1]).

Wenden wir uns zuerst der Rolle der Ionen bei Durchtritt eines Neutralsalzes zu.

Die Tatsache, daß gleiche Anionen mit verschiedenen Kationen verschiedene Eindringungsfähigkeit besitzen, zeigt auf die Kationenwirkung hin. Die verschiedene Durchlässigkeit des Plasmas für die Salze mit demselben Kation und verschiedenen Anionen zeigt uns dagegen, daß hier den Anionen eine nicht minder wichtige Bedeutung als den Kationen zukommt.

Wir haben es also bei der Aufnahme von Neutralsalzen durch das Plasma mit einer additiven Wirkung der Salze zu tun.

Es entsteht nun die interessante Frage: haben die beiden Ionen eines Salzes bei der Aufnahme eine identische Wirkung, wenigstens qualitativ, oder ist sie verschieden? Kurz gesagt, wirken die beiden Ionen permeabilitätsfördernd?

Um dieses zu verstehen, müssen wir die Kolloidwirkung der Salze näher besprechen.

Wir haben früher[2]), im Anschluß an die Untersuchungen von Hansteen-Cranner[3]), die Vermutung ausgesprochen, daß die Salzaufnahme durch die Ausfällung der Lipoide auf der Plasmaoberfläche reguliert werden kann. Die starkfällenden Salze verdichten die Oberflächenschicht des Plasmas und gelangen infolgedessen sehr langsam in das Innere. Aus diesem Grunde resultiert auch die lyotrope Anionenreihe bei der Giftwirkung der Salze.

Als beweisend erschien von unseren eigenen Beobachtungen dabei die Unmöglichkeit, die der Salzwirkung ausgesetzte Oberflächenschicht des Plasmas durch Säuren umzuladen. Die Anionenreihe blieb im sauren Medium dieselbe wie im neutralen.

Zugunsten des überwiegenden Lipoidgehaltes in Plasmaoberflächenschichten spricht noch eine andere Tatsache, auf die wir später zu sprechen kommen.

Daß die Ausfällung bzw. Verdichtung der Oberflächenkolloide des Plasmas bei den Permeabilitätsverhältnissen der Neutralsalze eine hervorragende Rolle spielt, dafür haben die kurz veröffent-

[1]) Vgl. Szücs, Jahrb. f. wiss. Botan. **52**, 85. 1913.

[2]) l. c.

[3]) l. c.

lichten Untersuchungen von Spek[1]) über die Wirkung der Salze auf die Biokolloide von Actinospaerium einen guten Beweis geliefert.

Der erwähnte Autor gelangte auf Grund ausgedehnter Versuche zum Resultate, daß „Fällungsvermögen und Eindringungsvermögen zueinander umgekehrt proportional sind“ und „daß um so höhere Konzentrationen eines Salzes vertragen werden, je schwerer das betreffende Salz eindringt“[2]).

Die für das Heliozoenplasma aufgestellte Fällungsreihe der Kationen ist folgende: K < Na < Li < Ca. Die für die Permeabilität des Pflanzenplasmas gefundene Kationenreihe stimmt vollständig mit dieser Reihe überein; es ist gezeigt, daß ein Salz, welches das schwächste Kolloidfällungsvermögen besitzt, am besten eindringt.

Unsere Versuche bestätigen den Parallelismus zwischen Kolloidfällungsvermögen und Eindringungsfähigkeit in bester Weise. Es gilt auch beim Pflanzenplasma der Satz, daß je kolloidaktiver ein Neutralsalz, desto geringer sein Eindringungsvermögen ist und umgekehrt.

Der schon früher angedeuteten Ansicht über die Beziehungen zwischen dem Lipoidfällungsvermögen und Eindringungsfähigkeit der Neutralsalze können wir jetzt auf Grund der vorliegenden Versuche folgendes zufügen:

Die Tatsache, daß ein kleiner Zusatz eines gut permeierenden Salzes, wie das Kaliumbromid, zu einem schwer permeierenden, wie das Natriumsulfat, das Eindringungsvermögen des letzteren erhöht (siehe Tabelle VII), weist darauf hin, daß das Kaliumbromid die kolloidfällende Wirkung des Natriumsulfats zu einem gewissen Grade paralysiert, d. h. eine lösende Wirkung aufzeigt. Daß aber von zwei Kaliumsalzen das eine lösend, das andere fällend wirkt, kann nur dann möglich sein, wenn das Kation fällend, das Anion aber fällungshemmend bzw. lösend wirkt. Damit kommen wir zur Tatsache, die bei den Neutralsalzwirkungen auf Eiweißkörper und Lipoide bekannt ist[3]), nämlich, daß die additive Wirkung eines Neutralsalzes hier als die algebraische Summa aufzufassen ist, die aus

[1]) Acta zoologica **165**. 1921.

[2]) Auf die weiteren Ergebnisse dieser höchst interessanten Arbeit sei hier hingewiesen.

[3]) Pauli, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **3**, 226. 1902; **5**, 27. 1903. — Porges und Neubauer, diese Zeitschr. **7**, 152. 1907.

zwei Summanden mit verschiedenen Vorzeichen resultiert.

Bekanntlich kommen beim Plasma hauptsächlich negative Kolloide in Betracht, gegebenenfalls — Lipoide [1]), und sie werden durch die entgegengesetzt geladenen Ionen, — Kationen ausgeflockt, dagegen wirken die Anionen, die mit Plasma gleiche Ladung haben, fällungshemmend.

Unter diesem Gesichtspunkt nimmt die Fähigkeit der Kationen, die Lipoide auf der Plasmaoberfläche auszuflocken, nach der Reihenfolge K < Na < Li < Mg < Ba < Ca zu, wobei die Fällungskraft der zweiwertigen Kationen die der einwertigen bedeutend überwiegt. Die fällungshemmende Wirkung der Anionen wächst nach der lyotropen Reihenfolge Citrat < SO_4 < Tartrat < Cl < NO_3 < Br < J. Ein jedes Kation in Verbindung mit den Anionen dieser Reihenfolge hat die stärkste Fällungskraft mit dem Citrat, weil dieses Anion den schwächsten fällungshemmenden Einfluß ausübt und infolgedessen die Koagulationsenergie des Kations sehr wenig verringert wird. Die Folge davon ist, daß Citrate sehr schwer durch die verdichtete Plasmaoberfläche ins Innere gelangen. Bei den anderen Anionen, wie z. B. beim Tartrat, ist die hemmende Wirkung schon größer und demgemäß die Ausflockungskraft des Kations geringer. Tartrate zeigen auch ganz deutlich die Eindringungsfähigkeit. Das Chlorion kann schon in einigen Fällen, wie z. B. bei KCl, etwa die Fällungskraft des Kations kompensieren, was mit dem großen Eindringungsvermögen dieses Salzes im Einklang steht.

Bei den Nitraten, insbesondere aber bei den Bromiden und Jodiden, kann die hemmende (resp. lösende) Wirkung des Anions die fällende des Kations überwiegen. Diese Salze dringen je nach dem Kation sehr rasch in das Plasma ein und entfalten aus diesem Grunde eine große Giftwirkung. Zu den schwer eindringenden Salzen, wie den Sulfaten der Alkalien, zugefügt, fördern sie die Aufnahme der letzteren, weil die lösende Wirkung der zugesetzten Anionen die Erzeugung einer dichten Haptogenmembran hindert.

Ein Antagonismus zwischen beiden Ionen eines Salzes wurde auch von Spek[2]), insbesondere deutlich beim Magnesiumsulfat, beobachtet.

---

[1]) Vgl. Porges und Neubauer, l. c.

[2]) l. c. S. 176, 177.

Dieses Salz zeigt im Gegensatz zum $MgCl_2$, das leicht in Actinosphaerien eindringt und daher sehr giftig ist, mehrere Stunden, sogar Tage lang keine schädliche Wirkung auf die Heliozoen. Der Autor meint, daß beim $MgSO_4$ ein auffälliger starker Antagonismus zwischen beiden Ionen existiert, „der bewirkt, daß keines der beiden seine charakteristischen spezifischen Wirkungen entfalten kann und der dadurch verursacht wird, daß die beiden Ionen, wenn sie zusammenwirken, die Permeabilität der Zelle jedenfalls durch gegenseitige Steigerung ihrer Fällungswirkung verringern, so daß sie selbst nicht mehr in die Zelle hineingelangen können".

Zusammenfassend können wir über die Permeabilitätsverhältnisse sagen, daß die Anionen nach der lyotropen Reihe $J > Br > NO_3 > Cl >$ Tartrat $> SO_4 >$ Citrat die Aufnahme eines Salzes fördern, die Kationen der Reihenfolge $K < Na < Li < Mg < Ba < Ca$ nach sie hindern.

Gehen wir nun zu den sog. antagonistischen Salzwirkungen.

Auf Grund unserer Versuche können wir diese Wirkungen bei den Neutralsalzen auf die Permeabilitätsverminderung des Plasmas zurückführen, die durch das entgiftend wirkende Salz bewirkt wird.

Bekanntlich wurde diese Tatsache auch von Szücs[1]) bei den antagonistischen Wirkungen Cu + Al und Chininhydrochlorid + Neutralsalze festgestellt.

In Salzgemischen gelten Calciumsalze als unentbehrliche Bestandteile der physiologisch ausgeglichenen Lösungen[2]). Ein kleiner Zusatz von Calciumsalz zu einer Salzlösung, die allein giftig ist, hebt die schädliche Wirkung völlig auf.

Nun haben diese Versuche gezeigt, daß kleine Mengen eines Calciumsalzes das Eindringungsvermögen eines gut permeierenden Salzes vollständig herabsetzt. Dieselbe Fähigkeit in etwas geringerem Maße besitzen auch andere Erdalkalien, wie Barium, vermutlich auch Strontium[3]) und weniger das Magnesium.

[1]) l. c.

[2]) Osterhout, Botan. Gaz. **42**, 127. 1906; **44**, 259. 1907. — Wo. Ostwald, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **106**, 568. 1905. — Benecke, Ber. d. Dtsch. Bot. Ges. **25**, 322. 1907. — Höber, Physikalische Chemie der Zelle usw. 1914, S. 524ff.

[3]) Dieses Salz wurde von uns nicht auf seine Eindringungsfähigkeit untersucht. In der Tröndleschen Permeabilitätsreihe steht Sr zwischen Ca und Ba. Da nun unsere Ergebnisse mit denen von Tröndle völlig übereinstimmen, so dürfte auch die Hemmungsregel für dieses Salz seine Kraft haben.

In allen diesen Fällen ist die entgiftende Wirkung eines Salzes durch die hohe Aktivität des zweiwertigen Kations bedingt, die die lösende Wirkung des Anions weit überwiegt. Das antagonistisch wirkende Salz dringt selbst schwer oder gar nicht in das Plasma ein und erschwert infolge der erzeugten Schutzschicht auch den Durchtritt eines gut permeierenden Salzes. Es kann in einigen Fällen die entgiftende Wirkung des zweiwertigen Kations durch das einwertige Kation, welches entgiftet wird, noch verstärkt werden, wenn das letztere Salz auch eine schwache Kolloidaktivität besitzt, wie z. B. NaCl, bei welchem die fällende Wirkung des Kations, die des Anions etwas überwiegt. Beim Zusammenwirken eines solchen schwach fällenden Salzes mit einem stark fällenden füllt das erstere, wie das Spek meint, „mit seiner feineren Fällung gewissermaßen die ‚Löcher' der groben aus und verzögert eine Weile das Eindringen der Salzflut"[1]).

Nach der oben entwickelten Theorie über die antagonistische Wirkung zwischen dem Kation und Anion eines Neutralsalzes kann ein beliebiges Salz entgiftend wirken, wenn das Fällungsvermögen seines Kations größer ist als die entgegengesetzte Wirkung des Anions. Bei den Alkalisalzen ist diese entgiftende Wirkung im allgemeinen verhältnismäßig schwach, in einigen Fällen kann sie nur eine kurze Zeit dauern. Sie kommt besser zum Vorschein in relativ hohen Konzentrationen der Salzlösungen (in schwach hypertonischen bzw. hypotonischen) infolge des schwachen Kations.

Wir haben gesehen, daß die Aufnahme von Kaliumnitrat und -chlorid durch das Lithiumchlorid bzw. Kaliumsulfat und -citrat verzögert wird (siehe Tabelle V, VI, VII). Diese Salze haben entweder sehr schwache fällungshemmende Anionen, wie das Sulfat- und Citration, welche die kolloidfällende Kraft des Kations wenig verringern, oder das von den Alkalikationen am stärksten kolloidaktive Kation, wie das Lithiumion. Daß ein Alkalisulfat, welches die Eindringungsfähigkeit eines gut permeierenden Salzes etwas herabsetzt, damit auch die Giftwirkung des letzteren vermindert, geht aus dem folgenden Versuch hervor.

Kleine viereckige Epidermisschnitte von Tradescantia zebrina (Blattunterseite) wurden parallel in Lösungen von KJ 0,1 Mol. und KJ 0,1 + Na_2SO_4 0,05 Mol. (Gesamtkonzentration 0,15 Mol.)

[1]) l. c. S. 190.

gelegt und nach bestimmten Zeitabschnitten je 10 herausgenommen und wieviele Zellen noch lebendig waren mittels Plasmolyse in Zuckerlösung bestimmt[1]).

	Die Zeit des Aufenthalts der Schnitte in Lösungen					
	2 St.	4 St.	8 St.	12 St.	14 St.	16 St.
	Das Mittelprozent der plasmolysierten Zellen in 10 Schnitten					
KJ	98,7	91,0	88,0	38,5	37,1	2,3
KJ + Na_2SO_4 .	100,0	100,0	100,0	96,1	77,8	43,1

Wie man aus diesem Versuch sieht, sterben in der reinen Kaliumjodidlösung nach 16 Stunden fast alle Zellen ab, während im Gemisch mit Natriumsulfat nach dieser Zeit fast die Hälfte der Zellen noch lebend bleibt.

In diesem Falle haben wir also eine schwache entgiftende Wirkung durch das Sulfat, die theoretisch vorausgesagt werden konnte. In anderen Fällen kann aber eine schwach antagonistische Wirkung bei den Alkalisalzen auch schon dadurch zustande kommen, daß zwei Salze in der Lösung ein gemeinsames Ion haben, wie z. B. KCl und NaCl, denn dadurch wird die Dissoziation etwas zurückgedrängt; hauptsächlich kommen hier die Ionen als die wirksamen Anteile der Salze in Betracht. Bei den Erdalkalien wurde aber diese Dissoziationsbeeinflussung im Vergleich mit der spezifischen Wirkung dieser Salze zu gering sein.

Einen guten Beweis für den Zusammenhang zwischen den Permeabilitätsverhältnissen und der Kolloidwirkung der Neutralsalze liefern uns auch die Versuche von Brenner[2]). Er untersuchte die Säureresistenz von Rotkraut-Hypodermiszellen bei Anwesenheit von Neutralsalzen und fand, daß die letzteren in weitem Maße die Giftigkeit der H-Ionen beeinflussen.

Greifen wir aus den Daten von Brenner einige heraus. Die kritische Konzentration von HCl bei Anwesenheit von isotonischen Kaliumsalzlösungen (Salze isoton. 3,75% KNO_3) ist bei NO_3 $^{M}/_{800}$; Cl $^{M}/_{600}$; SO_4 $^{M}/_{400}$. Die Giftigkeit der Salzsäure wird hier also nach der lyotropen Reihenfolge $NO_3 < Cl < SO_4$ verringert. Bei Anwesenheit von Kationen der Chloride ist die kritische Konzentration bei Na $^{M}/_{1000}$; K $^{M}/_{600}$; Mg $^{M}/_{400}$; Ca $^{M}/_{250}$; also $Na < K < Mg < Ca$.

Man sieht, daß hier etwa dieselben Anionen- und Kationenreihenfolgen von Bedeutung sind wie bei der Permeabilität bzw.

[1]) Dieser Versuch ist gleichzeitig mit denen der II. Mitteilung gemacht.
[2]) Ber. d. Dtsch. Bot. Ges. 38, 277. 1920.

Kolloidfällung. Daß die Säure bei Anwesenheit des Salzes viel schwerer in die Zelle eindringt, das hat **Brenner** bei den kolloidaktiven K_2SO_4, $MgSO_4$, $CaCl_2$ unmittelbar beobachtet[1]).

Es ist noch ferner zu bemerken, daß auch die Nichtelektrolyte die Eindringungsfähigkeit von Säuren bzw. Salzen herabsetzen können. Bekanntlich wird nach den Beobachtungen von **Küster**[2]) auf der Plasmaoberfläche durch die Behandlung mit Zuckerlösung eine Haptogenmembran erzeugt.

Fragen wir nun, welches sind die Beweise für die Annahme, daß bei den Neutralsalzwirkungen gerade die Lipoide die wichtige regulatorische Rolle spielen.

Zugunsten der Lipoide sprechen folgende Tatsachen: 1. Die Nichtumladbarkeit der Oberflächenkolloide. 2. Die große Fällungskraft der Erdalkalien, welche sich in dem ausgesprochenen Entgiftungsvermögen dieser Salze widerspiegelt. Bekanntlich ist die Ausflockungsenergie der Erdalkalien in bezug auf die Lipoide in verdünnten Lösungen ($^1/_{100}$ bis normal) ebenso groß, wie in konzentrierteren (1 bis normal und höher)[3]). Bei den Eiweißfällungen durch die Erdalkalien liegen aber die Werte viel höher, z. B. wird das Alkalieiweiß erst durch die vier- bis siebenfach normale $CaCl_2$-Lösung gefällt[4]). Auch die Koagulation des nativen Eiweißes bedarf starker Erdalkalilösungen[5]).

Es sei hier noch hervorgehoben, daß die Tatsache, daß sich das Magnesium nach seiner Aktivität beim nativen Eiweiß an die Alkalisalze anschließt, bei der Lipoidfällung sich dagegen wie ein typisches Erdalkalisalz verhält, kein entscheidendes Kriterium dafür liefert, ob Lipoide vorliegen, wie das manche Autoren vermuten, wenn nämlich die Aktivität des Magnesiums in bezug auf die Biokolloide mit der des Ca, Ba und Sr übereinstimmt. Die Eiweißkörper des Protoplasmas besitzen die Eigenschaften des ionischen Eiweißes bzw. Alkalieiweißes und hier schließt sich das Magnesium nach seiner Kolloidaktivität an die Gruppe der Erdalkalien an, während die Alkalisalze bedeutend schwächer wirken[6]).

[1]) l. c. S. 282.

[2]) Zeitschr. f. Botan. **2**, 689. 1910.

[3]) Porges und Neubauer, l. c. Vgl. auch Hansteen-Cranner, l. c.

[4]) Pauli und Handowsky, diese Zeitschr. **24**, 246. 1910.

[5]) Hofmeister, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **24**, 247. 1888; **25**, 3. 1889. — Pauli, l. c. 1902, 1903.

[6]) Pauli und Handowsky, l. c. S. 241, 250.

3. In schwach alkalischen Lösungen ist die Verkürzung der Wurzeln, sowie auch die Wiederausdehnung immer etwas größer als parallel im neutralen Medium (siehe Tabelle VIII).

Tabelle VIII.

Temperatur 18—20°.

Salz (Konzentration in Mol.)	I. Serie			II. Serie		
	K %	*D* %	*E* %	*K* %	*D* %	*E* %
NaCl 0,20	6,1	1,5	24,6	4,6	2,0	43,5
NaCl 0,1975 + NaOH 0,0025 .	8,6	3,2	37,2	7,5	3,3	44,0
NaCl 0,190 + Na_2CO_3 0,005 .	8,0	3,2	40,0	7,7	4,6	59,7

Aus dieser Gegenüberstellung ist ersichtlich, daß die Verkürzung und auch die Ausdehnung der Wurzelspitzen in den alkalisch reagierenden Lösungen sehr deutlich begünstigt wird.

Dieser Befund stimmt in allerbester Weise mit den von Hansteen-Cranner[1]) entwickelten Vorstellungen über den Bau der Zellwand und Plasmaoberflächenschichten. Nach diesem Autor ist die Zellwand „aller lebenden Zellen ein kolloidales Netzwerk, dessen festes Gerüst aus Cellulose und Hemicellulose gebildet ist, dessen Maschen aber die Lipoide der plasmatischen Grenzschichten enthalten".

Von dieser Anschauung ausgehend, läßt sich die größere Kontraktion bzw. Ausdehnung der Wurzeln im alkalischen Medium dadurch erklären, daß die Kolloidstränge, welche von der Plasmaoberfläche in die Maschen des Wandnetzwerkes eingelagert sind, durch Lauge aufgelockert oder ganz aufgelöst werden und infolgedessen die Zellwand mehr contractil wird.

Durch schwach alkalische Lösungen können aber eher fettähnliche Körper als Eiweißstoffe gelöst werden und so spricht diese Beobachtung zugunsten des überwiegenden Lipoidgehaltes in den plasmatischen Oberflächenschichten. Durch die Auflösung bzw. Aufquellen der Lipoide auf der Plasmaoberfläche und in der Zellwand wird auch der Durchtritt der Salze gefördert. Ferner zeigt die größere Contractilität der Zellwand im alkalischen Medium, daß die regulatorische Funktion bei der Stoffaufnahme auch auf die Zellwand übergeht, die mit den Plasmaoberflächenschichten in engster organischer Verbindung steht[2]).

[1]) l. c.

[2]) Vgl. Hansteen-Cranner, l. c.

Die Beziehungen zwischen den Neutralsalzwirkungen werden im alkalischen Medium von der qualitativen Seite nicht geändert, sie bleiben hier dieselben wie im neutralen, es treten dieselben Permeabilitätsreihenfolgen der Anionen und Kationen auf.

Welche Bedeutung hier den CO_3-Ionen zukommt, die fast immer in den alkalischen Lösungen vorhanden sind, muß vorläufig dahingestellt bleiben. Vermutlich spielen hier die OH-Ionen eine Hauptrolle.

Außer der permeabilitätsfördernden Wirkung infolge der Lipoidverseifung auf der Plasmaoberfläche haben schwache Laugen noch eine äußerst wichtige biologische Bedeutung.

Es wurde schon oben erwähnt, daß Faktoren, welche die Permeabilität des Plasmas für Neutralsalze erhöhen, auch die Giftwirkung derselben steigern[1]). Nun ist aber die Giftigkeit der Salze im alkalischen Medium viel geringer, als im neutralen. Dieser scheinbare Widerspruch erklärt sich durch die besondere kolloidchemische Wirkung der OH-Ionen.

Es wurde früher bemerkt, daß im lebenden Plasma ionisierte Eiweißkörper in Betracht kommen. Nach Paulis und Loebs Anschauungen können die anorganischen Stoffe im Plasma nur in Verbindung mit organischen Zellbestandteilen vorkommen[2]). Die Reaktion des Protoplasmas ist in den meisten Fällen alkalisch, was auf eine Alkalieiweißverbindung hinweist[3]). Die Untersuchungen von Pauli und Handowsky[4]) haben gezeigt, daß beim Alkalieiweiß (bzw. Säureeiweiß) gewaltige Unterschiede im Vergleich mit dem nativen auftreten. Bei gewissem Laugengehalt wird die Hitzegerinnbarkeit vollständig aufgehoben, gleichzeitig geht auch die Alkoholfällbarkeit verloren. Ein solcher großer Widerstand gegen koagulierende Einflüsse wird durch die starke Hydratation der Eiweißionen bedingt[5]). Alle Faktoren, die die Ionisation zurückdrängen, machen auch Proteine gegen koagu-

[1]) Vgl. meine II. Mitteilung.

[2]) Pauli, Kolloidchemie der Muskelkontraktion. 1912, S. 8.

[3]) Pfeffer, Untersuchungen. Tübingen 1886, S. 293ff. Physiologie I, S. 491. Vgl. Szücs, Sitzungsber. d. Wien. Akad. **119** (I), 737. 1910.

[4]) l. c., vgl. auch diese Zeitschr. **18**, 340. 1909. — Pauli, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **136**, 483. 1910.

[5]) Pauli, Kolloidchemie der Eiweißkörper, 1920, S. 89ff. — Handowsky, Fortschritte in der Kolloidchemie der Eiweißkörper, 1911, S. 19ff.

lierende Einflüsse instabil, dagegen wird bei der Erhöhung der Ionisation die Stabilität der Eiweißstoffe gesteigert.

Daß ionisierte Eiweißkörper im Pflanzenplasma vorhanden sind, das folgt schon daraus, daß die Temperatur der Hitzekoagulation des Plasmas bei höheren Pflanzen viel höher liegt als beim nativen Eiweiß. So koaguliert die Plasmamembran von Tradescantia discolor ungefähr bei 72° C, die von Ampelopsis und Rotkrautzellen[1]) durchschnittlich bei 70°. Das amphotere Eiweiß aber etwa bei 62° C[2]).

Im alkalischen Medium ist die Koagulationstemperatur des Protoplasmas höher als im neutralen, ebenso wird Plasma bei Anwesenheit von OH-Ionen viel resistenter gegen andere koagulierende Einflüsse[3]).

Alles das erklärt sich dadurch, daß im schwachalkalischen Medium die Ionisation bzw. Hydratation des Alkalieiweißes des Plasmas erhöht wird und daher die Stabilität kommt. Dagegen im schwachsauren[4]) Medium, wie das auch theoretisch vorausgesagt werden kann, koaguliert Plasma viel leichter als im neutralen[3]).

Die antagonistische Wirkung der Laugen in bezug auf die Neutralsalze ist ein kolloidchemischer Vorgang ganz anderer Art, als die entgiftende Wirkung der Neutralsalze. Bei den letzteren tritt das Lipoidfällungsvermögen in den Vordergrund. Die Wirkung der OH-Ionen ist aber viel komplizierter. Einerseits können sie durch die Lipoidlösung die Permeabilität des Plasmas für Salze erhöhen und damit neutralisierend bzw. dehydratisierend auf ionisches Eiweiß der lebenden Substanz wirken. Andererseits hat aber die Lauge die Tendenz die Ionisation bzw. Hydratation des Plasmaeiweißes zu erhöhen. Der Gleichgewichtszustand wird vermutlich die erste Zeit zugunsten der überwiegenden Ionisation bestehen, da schwache Laugen eine weitgehend entgiftende Wirkung entfalten.

---

[1]) Blattepidermiszellen.

[2]) Vgl. Lepeschkin, Ber. d. Dtsch. Bot. Ges **29**, 256. 1911.

[3]) Lepeschkin, Ber. d. Dtsch. Bot. Ges. **28**, 94. 1910.

[4]) Hier kommen nur solche niedrige Konzentrationen der Laugen und Säuren in Betracht, die für das Leben des Plasmas nicht gefährlich sind.

Über die Chlorverteilung im Blute.

Von

S. van Creveld.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Groningen.)

(Eingegangen am 2. August 1921.)

Die theoretisch wie praktisch so wichtigen Fragen nach der Permeabilität der roten Blutkörperchen für Chlor und der Chlorbindung im Plasma (Serum) sind in den letzten Jahren mehrfach behandelt worden. Eine Reihe eigener Beobachtungen, die ich über diesen Gegenstand machte, sollen im folgenden mitgeteilt werden. Gleichzeitig mögen einige kritische Bemerkungen zu einigen neueren Arbeiten angefügt werden.

I. Die Chlorpermeabilität der roten Blutkörperchen.

Seitdem Hamburger mit dieser Frage das Problem der Permeabilität tierischer Zellen zuerst zur Diskussion gestellt hat[1]), ist sie in der Literatur sehr oft behandelt worden.

In der letzten Zeit haben unter anderen Falta und Richter-Quittner[2]), Straub und Meier[3]), Siebeck[4]) und in einer sehr rezenten Arbeit auch Wiechmann[5]) über die Chlorpermeabilität der Blutkörperchen Mitteilungen gemacht. Die erstgenannten Autoren schließen auf Grund einer großen Anzahl von Chlorbestimmungen, daß im strömenden Blute bei Menschen und verschiedenen Tieren die Blutkörperchen chlorfrei sind. Dieses fast allen Ergebnissen früherer Untersuchungen widersprechende Resultat führen sie auf die besondere Vorsorge, die sie bei der Gewinnung des Plasmas getroffen haben, zurück. Diese bestand in der Verwendung des Hirudins, dem Vermeiden von Na-Oxalat und NaF zur Ungerinnbarhaltung des Blutes; ferner im sofortigen Zentrifugieren und Vermeiden starker Abkühlung des Blutes. Trotzdem möchten wir bezweifeln, daß auch Falta und Richter-Quittner damit Verhältnisse studiert haben, wie sie im strömenden Blute bestehen. So haben sie einem Verlust von CO_2 beim Auffangen des Blutes nicht vorgebeugt; aus den Versuchen von Hamburger[6]),

---

1) Hamburger, Zeitschr. f. Biol. 1899, S. 414.
2) Falta und Richter-Quittner, diese Zeitschr. **100**, 180. 1920.
3) Straub und Meier, diese Zeitschr. **98**, 205. 1919.
4) Siebeck, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **85**, 214. 1919.
5) Wiechmann, Archiv f. Physiologie **189**, 109. 1921.
6) Hamburger, Zeitschr. f. Biol. **28**, 405. 1892.

Snapper[1]), Fridericia[2]), van Slyke und Cullen[3]) und anderen geht aber der große Einfluß der CO_2-Spannung auf die Chlorverteilung im Blute hervor. Schon kleine Veränderungen in dieser Spannung können wichtige Änderungen in der Chlorverteilung hervorbringen. Denselben Effekt verursacht Zu- oder Abnahme des Sauerstoffsättigungsgrades des Blutes indirekt, indem die CO_2-Kapazität des Blutes bei Sättigung mit Sauerstoff abnimmt, bei Reduktion zunimmt[4]). Tatsächlich wird diese Sauerstoffsättigung von venösem Blute beim Auffangen (und Schütteln?) in offenen Röhrchen, wie Falta und Richter-Quittner getan haben, verändert[5]). Ob weiter das von ihnen verwendete Hirudin im Vergleich mit Na-Oxalat oder NaF für die normale Durchlässigkeit der Blutkörperchen so harmlos ist wie die genannten Autoren hervorheben, erscheint uns auf Grund von Erfahrungen im hiesigen Laboratorium bei Studien über die Glucosepermeabilität der Blutzellen höchst zweifelhaft. Nur wenn der Beginn der Gerinnung des Blutes hintenangehalten worden war, wurden die Blutkörperchen in osmotischen und direkt chemischen Versuchen glucosefrei gefunden. Die sog. ungerinnbar machenden Agenzien wie Hirudin, Oxalat, NaF waren gleich schädlich[6]). Straub und Meier[7]) haben sich bei ihren Versuchen über die Permeabilität der Blutzellen für Chlor noch weiter von den physiologischen Verhältnissen entfernt. Sie haben die CO_2-Bindungskurve von in 0,9% NaCl suspendierten Körperchen festgestellt bei allmählicher Zunahme der CO_2-Spannung. Bei einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration der Suspensionsflüssigkeit konstatierten sie eine plötzliche Zunahme der CO_2-Bindung. Die Autoren meinen dies dadurch erklären zu sollen, daß bei dieser Wasserstoffionenkonzentration die Körperchen plötzlich permeabel für Chlor werden. Dieses verbindet sich nämlich mit dem Hämoglobin, wodurch dasselbe mehr CO_2 aufnehmen könne. Die plötzliche Permeabilitätsänderung der Körperchen würde auf eine bei der bestimmten Wasserstoffzahl ($p_H = 6{,}67$) zustande kommende Änderung des Kolloidzustandes dieser Membran beruhen.

Diese Annahme — daß die Ionendurchlässigkeit der Zellen abhängig ist von den kolloiden Eigenschaften der Zellmembran — wird tatsächlich gestützt durch viele neuere Untersuchungen. Straub und Meier arbeiten aber mit Blutkörperchen, die mit 0,9 proz. NaCl gewaschen worden waren. Wie aus Untersuchungen im hiesigen Laboratorium[8]) hervorgeht, bleibt dabei aber die Konstitution der Zellmembrankolloide nicht intakt; die für eine normale Permeabilität notwendigen Bestandteile werden vielmehr teilweise entfernt. Weiter spielen die Plasmabestandteile eine so wichtige Rolle bei der Verteilung des CO_2 — und deshalb auch bei der Cl-Wanderung — zwischen Plasma

[1]) Snapper, diese Zeitschr. **51**, 62. 1913.

[2]) Fridericia, Journ. of biol. chem. **42**, 245. 1920.

[3]) v. Slyke und Cullen, Journ. of biol. chem. **30**, 343. 1917; siehe auch v. Slyke, Physiological Reviews **1**, 161. 1921.

[4]) Christiansen, Douglas und Haldane, Journ. of physiol. **48**, 244. 1914. — Joffe und Poulton, Journ. of physiol. **54**, 129. 1920.

[5]) Siehe weitere Notiz S. 306.

[6]) Brinkman und Frl. v. Dam, Arch. internat. de physiol. **15**, 105. 1919. — v. Creveld und Brinkman, diese Zeitschr. **119**, 65. 1921.

[7]) l. c.

[8]) Brinkman und Frl. v. Dam, diese Zeitschr. **108**, 35. 1920.

und Körperchen[1]), daß Untersuchungen über die Chlorpermeabilität. angestellt in dem Suspensionsmedium 0,9 proz. NaCl, Verhältnisse behandeln, die weit von den physiologischen abweichen.

Wir meinen deshalb, daß weder die Untersuchungen von Straub und Meier, noch die von Falta und Richter - Quittner Aufschluß geben über die Chlorpermeabilität der Körperchen im strömenden Blute. Auch aus den Untersuchungen von Siebeck[2]) und Wiechmann[3]) darf man u. E. keine Schlüsse ziehen betreffs der physiologischen Chlorpermeabilität. Diese Autoren arbeiteten zuerst mit defibriniertem oder Citrat- oder Hirudinblut, das ohne Vorbeugung der CO_2-Entweichung aufgefangen wurde[4]). Für die Chlorverteilung auf Plasma (Serum) und Körperchen erhielten sie fast dasselbe Verhältnis wie Snapper[5]) schon vor einigen Jahren bei derartigen Versuchen im hiesigen Institut gefunden hat. Weiter untersuchten sie die Permeabilität von Körperchen suspendiert in einer isotonischen Lösung von NaCl oder Na_2SO_4 oder Rohrzucker. Die Ionenpermeabilitätsverhältnisse von Körperchen in solchen Lösungen untersucht, sind jetzt als abnorm zu betrachten, wo wir wissen, daß diese Lösungen die Körperchenoberfläche nicht intakt halten. Die Bestandteile, die entfernt werden, sind in Rohrzucker- und Salzlösungen nicht dieselben.

In bezug auf eine mögliche Erklärung der Ergebnisse, die in diesen und dergleichen Untersuchungen erhalten wurden[6]), sei weiter hingewiesen auf eine neulich in dieser Zeitschrift erschienene Arbeit aus dem hiesigen Institut von Takeo Takei über osmotische und kolloidchemische Volumveränderungen.

Das Bestehen einer Chlorpermeabilität der Erythrocyten schien uns schon deutlich angezeigt durch die genannten Untersuchungen über den Einfluß von CO_2 auf die Chlorverteilung im Blute. Die Aktualität der Frage und der Gedanke, daß diese mangelhafte Übereinstimmung in den direkten Analysen anderer Autoren auf methodische Fehler zurückzuführen war, rechtfertigen u. E. neue, unter physiologischen Verhältnissen ausgeführte Untersuchungen über die Chlorverteilung. Von den methodischen Fehlern haben wir die wichtigsten schon besprochen. Den Gerinnungsfaktor hat man auch bei der Feststellung

---

[1]) Joffe und Poulton, l. c.

[2]) l. c.

[3]) l. c.

[4]) Von Wiechmann wurde die CO_2 durch halbstündiges Durchleiten von O_2 ausgetrieben. Eine solche Überventilation des Blutes zur Entfernung der CO_2 verursacht aber eine irreversible Veränderung im Kohlensäurebindungsvermögen und deshalb auch indirekt eine Änderung im Cl-Gehalt und Cl-Aufnahmefähigkeit der Erythrocyten (H. W. Haggard und Yandell Henderson, Journ. of biol. chem. 45, 209 u. 219. 1920; siehe auch B. 6, 404 u. 405. 1921).

[5]) Snapper, diese Zeitschr. 51, 53. 1913.

[6]) Rohonyi, Kolloidchem. Beih. 8, 337. 1916. — Rohonyi und Loránt, Kolloidchem. Beih. 8, 377. 1916.

von dem CO_2-Einfluß vernachlässigt. Nur Hamburger hat dazu Experimente in vivo ausgeführt an Pferdeblut, das ganz flüssig geblieben war [1]).

Eine Wiederholung von diesen Experimenten bei einer anderen Tierart konnte jetzt nicht als überflüssig betrachtet werden, weil das Pferdeblut sich wie bekanntlich durch die viel größere Senkungsgeschwindigkeit der Blutkörperchen von den anderen Blutarten unterscheidet[2]). Diese Eigenschaft ist neulich in Beziehung gebracht worden zu dem Verhältnis Cholesterin : Lecithin im Gesamtblut[3]), von welchem Verhältnis aber auch die Ionenpermeabilität der Zelloberfläche abhängig ist[4]). Deshalb war es angezeigt, die Chlorpermeabilität jetzt bei Körperchen von einer anderen Tierart zu untersuchen. Wir benutzten Kaninchen.

Methodik.

Die Chlorverteilung zwischen Plasma und Körperchen wurde untersucht im arteriellen und venösen Blut (Art. carotis und V. jugularis ext.). Hierzu wurde das Blut mittels einer paraffinierten Kanüle in kurz vor dem Versuch paraffinierten Röhrchen unter Paraffinöl aufgefangen und sofort schnell zentrifugiert, nachdem die vollen Röhrchen noch mit einem eingeschliffenen Stöpfel oder mit einem paraffinierten Korken geschlossen waren. Nach einigen Minuten Zentrifugieren wurde das flüssig gebliebene Plasma mittels einer paraffinierten Pipette abgehoben. Eine Cl-Bestimmung wurde ausgeführt im Plasma, im Gesamtblut, und endlich wurde das relative Volum der Körperchen bestimmt.

Für die Chlorbestimmung wurde die Veraschungsmethode nach v. Korányi mit der Modifikation von Visser angewendet[5]). Wenn nur kleine Mengen Blut oder Plasma zur Verfügung standen, benutzten wir die von Rusznyák angegebene Mikroveraschungsmethode[6]), die prinzipiell mit der Makromethode gleich ist. Die Anwendung einer vertrauenswerten Veraschungsmethode schließt die Möglichkeit aus, daß ein Teil des Chlors nicht bestimmt wird, wie es bei der Chlorbestimmung im Plasma mittels verschiedener Niederschlagsmethoden der Fall zu sein scheint[7]). Dieses gilt aber sicherlich nicht für alle Niederschlagsmethoden[8]). Der Cl-Gehalt ist ausgedrückt in Vol.-% NaCl. Immer ist das Mittel von 2 Bestimmungen angegeben worden.

Die Versuche mit arteriellem und venösem Blute sind in nebenstehender Tabelle zusammengestellt; man sieht, daß die Blutkörperchen im strömenden Blute immer Chlor enthalten. Weiter lehrt die Tabelle den Unterschied in der Chlorverteilung auf Körperchen und Plasma, der zwischen arteriellem und venösem Blute besteht. Die von Hamburger bei seinen Versuchen in vivo mit Pferdeblut

---

[1]) Hamburger, Arch. f. Anat. u. Physiol. 1893, S. 157.

[2]) Siehe u. a. de Haan, diese Zeitschr. **86**, 298. 1918.

[3]) Kürten, Arch. f. Phys. **185**, 248. 1920. — Brinkman und Frl. Wastl, neulich in dieser Zeitschr. erschienen.

[4]) Brinkman und Frl. v. Dam, diese Zeitschr. **108**, 35. 1920.

[5]) Siehe Snapper, diese Zeitschr. **51**, 56. 1913.

[6]) Rusznyák, diese Zeitschr. **114**, 23. 1921.

[7]) Rusznyák, diese Zeitschr. **110**, 60. 1921. — Falta und Richter-Quittner, diese Zeitschr. **91**, 381. 1918.

[8]) Siehe z. B. Smith, Journ. of biol. chem. **45**, 437. 1921. — Whitehorn, Journ. of biol. chem. **45**, 449. 1921.

erhaltenen Resultate wurden hier ganz bestätigt gefunden. Bei dem Übergang von arteriellem in venöses Blut findet also eine Chlorwanderung zwischen Plasma und Blutzellen statt und nicht allein zwischen den einzelnen Plasmabestandteilen[1]). Wie aus den Werten für das Gesamtblut, in Versuchen 1 und 2 erhalten, hervorgeht, muß daneben noch ein Cl-Austausch zwischen Blut und Gewebe stattfinden.

Tabelle I.

Prozentualer Chlorgehalt (in % NaCl) des Gesamtblutes und des Plasmas von arteriellem und venösem Blute nebst dem relativen Volumen der Blutkörperchen und dem Verhältnis $\frac{\text{Cl-Blutkörperchen}}{\text{Cl-Plasma}}$.

Kaninchen	Gesamtblut		Plasma		Relat. Volumen der Blutkörperchen		$\frac{\text{Cl-Blutkörperchen}}{\text{Cl-Plasma}}$ in %	
	venös	arteriell	venös	arteriell	venös	arteriell	venös	arteriell
1	0,568	0,562	0,614	0,649	27³/₄	24¹/₄	73	42,7
2	0,527	0,537	0,582	0,608	33³/₄	31	72	62
3	0,585	—	0,623	—	33¹/₂	—	82	—
4	0,537	—	0,607	—	38¹/₂	—	70	—
5	0,489	—	0,544	—	31	—	68	—
6	—	0,513	—	0,594	—	33	—	58,7

Das Verhältnis $\frac{\text{Körperchen-Cl}}{\text{Plasma-Cl}}$ ist auch unter normalen Verhältnissen nicht konstant[2]). Auf dieses Verhältnis kommen wir noch weiter unten zu sprechen.

Daß die Vernachlässigung des Einflusses von CO_2-Verlust tatsächlich so bedeutend für die Chlorverteilung ist, geht aus den Ergebnissen der folgenden Tabelle II hervor. In dieser sind die Resultate von Versuchen

[1]) In bezug auf den Unterschied im Cl-Gehalt des Plasmas (Serums) von arteriellem und venösem Blute sei erinnert an die Untersuchungen über die Wechselbeziehung zwischen den Werten des Blutes, welche respiratorischen Schwankungen unterworfen sind. Nach einer rezenten Mitteilung von L. J. Henderson (Journ. of biol. chem. **46**, 411; 1921) ist diese Korrelation für wenigstens die folgenden 6 Werte anzunehmen: freie und gebundene O_2 und CO_2, Wasserstoffionenkonzentration des Serums und Cl-Gehalt des Serums, und bei einer für zwei angenommene Wert sind die anderen vier bestimmt. Mit Hilfe einer geometrischen Darstellung von den Ergebnissen von ihm und früheren Autoren erhalten, lassen sich weiter nach Henderson für jeden Fall alle Werte leicht berechnen. Wie der Autor aber ausdrücklich hervorhebt, sind die Ergebnisse alle erhalten in Versuchen, die mit defibriniertem Blute in vitro ausgeführt wurden. Daß diese Warnung nicht überflüssig ist, geht unter anderem daraus hervor, daß Henderson berechnet, daß unter normalen Verhältnissen bei dem Übergang von arteriellem zu venösem Blute kein Austausch von Elektrolyten zwischen Serum und Körperchen stattfindet. Wir fanden aber in den Versuchen in vivo, daß eine solche Wanderung wohl geschieht.

[2]) Siehe auch Fridericia l. c.

vereinigt, bei denen das rasch aus einer Ohrvene tropfende Blut in offenen paraffinierten Röhrchen aufgefangen wurde. Die Röhrchen wurden dann schnell zentrifugiert. Auf diese Weise wurde Plasma erhalten von Blut, das kurze Zeit in Kontakt mit der Luft gewesen war, dessen Gerinnung aber auf einwandfreie Weise vorgebeugt war.

Tabelle II.

Kaninchen	Gesamtblut	Plasma	Rel. Vol. d. Körperchen	Cl-Blutkörperchen / Cl-Plasma
1	0,5074	0,5897	31 1/4	55%
2	0,4455	0,5198	41 1/2	65%
3	0,5031	0,5805	32	58%
4	0,4663	0,6201	24 1/2	Körperchen chlorfrei
5	0,4929	0,5733	36	61%
6	0,3979	0,5792	31	Körperchen chlorfrei
7	0,4680	0,6260	36	36%
8	0,4914	0,6084	29 1/2	43,1%
9	0,4995	0,5800	21	34%
10	0,4446	0,6377	29 3/4	Körperchen chlorfrei

Natürlich war die Verringerung der CO_2-Spannung und die Vermehrung der O_2-Sättigung bei diesen Versuchen in den einzelnen Fällen sehr verschieden. Das geht auch aus den Werten für das Verhältnis $\frac{\text{Körperchen-Cl}}{\text{Plasma-Cl}}$ hervor. Dreimal wurden die Körperchen frei von Chlor gefunden; während in den anderen Experimenten das Verhältnis im Vergleich mit den Werten für das venöse Blut in den Versuchen von Tabelle I erhalten niedriger, also zugunsten des Plasmas, war. Die Vernachlässigung von den Gasfaktoren allein genügt also, um ein Resultat zu erhalten, das nähert oder übereinstimmt mit dem das Falta und Richter-Quittner für physiologisch ansehen.

Die Cl-Wanderung kam in den letzten Versuchen mit offenen Röhrchen hauptsächlich während des Auffangens des Blutes zustande. Das geht m. E. aus Versuchen hervor, bei denen dem Kontakt mit der Luft während des Zentrifugierens durch Verschließen der vollen Röhrchen vorgebeugt wurde.

Tabelle III.

Kaninchen	Gesamtblut	Plasma	Rel. Vol. d. Körperchen	Cl-Blutkörperchen / Cl-Plasma
1	0,5207	0,6143	33	53,8%
2	0,4817	0,6527	30 1/2	Körperch. fast chlorfrei
3	0,4950	0,5955	34 1/2	60,6%
4	0,4505	0,5850	28 1/2	20%
5	0,5517	0,6423	32	56%
6	0,5636	0,6592	32 3/4	55,7%

Auch hier wurden also auseinandergehende Werte für das Verhältnis $\frac{\text{Cl-Körperchen}}{\text{Cl-Plasma}}$ erhalten. Meistens waren die Plasmawerte aber wieder relativ hoch, und einmal waren die Körperchen fast frei von Chlor.

Eine Konsequenz für die klinischen Chlorbestimmungen.

Es mag noch auf eine Konsequenz dieser Ergebnisse für die klinischen Chlorbestimmungen im Blute hingewiesen werden. Meistens werden diese noch in Serum angestellt, das ohne Berücksichtigung von einem der genannten, die Cl-Verteilung beeinflussenden Faktoren erhalten ist. Auch der Einfluß der Gerinnung wird vernachlässigt. Daß ein solcher Einfluß tatsächlich besteht, geht aus dem Folgenden hervor. Wenn man Plasma und Körperchen sofort nach der Gewinnung des Blutes trennt, mit Vorbeugung der Gerinnung (Paraffinmethode), dann findet man in den Körperchen, wie aus unseren Versuchen hervorgeht, schwankende Mengen, bisweilen gar kein Chlor. Trennt man beide aber, nachdem Gerinnung vollständig oder teilweise eingetreten ist, dann findet man, daß zwischen Cl-Gehalt von Körperchen und Serum ein ziemlich konstantes Verhältnis besteht. Nach den Angaben von Abderhalden[1]) ist $\frac{\text{Cl-Körperchen}}{\text{Cl-Serum}}$ dann ca. 30%, nach denen von Snapper[2]) ist dieses Verhältnis ca. 40%. In vivo ist, wie wir sahen, dieses Verhältnis nicht konstant und im venösen Blute jedenfalls viel höher. Um den „wahren" Cl-Gehalt des Plasmas zu bestimmen, würde es notwendig sein, das Blut mit Vorbeugung der CO_2-Entweichung in paraffinierten Röhrchen aufzufangen und sofort zu zentrifugieren. Beim Menschen hat man dann immer die Beschwerde, daß die CO_2-Spannung des venösen Blutes bei der für eine gut ausführbare Venaepunctio notwendigen Abklemmung des Blutgefäßes verändert sein wird. Auch wird die richtige Plasmagewinnung in der Klinik nicht immer gut ausführbar sein. Es fragt sich dann, ob man nicht einen geringeren Fehler macht durch Vornahme der Cl-Bestimmung im Gesamtblut statt wie heute im Serum. Namentlich in den pathologischen Fällen, wo der CO_2-Gehalt des Plasmas oder einer mit diesem korrelierenden Wert des Blutes stark verändert ist, wird der Fehler im letzten Falle groß sein können. Wenn man bei demselben Individuum mehrere Bestimmungen hintereinander macht, könnte man dann, um den Faktor der Schwankung des relativen Körperchenvolums zu umgehen, eine Bestimmung von diesem Volum mit der Cl-Bestimmung im Blute verbinden.

---

[1]) Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chemie. **25**, 106. 1898.

[2]) Snapper, diese Zeitschr. **51**, 56. 1913. — Siehe auch Veil, diese Zeitschr. **91**, 272. 1918 u. Siebeck, l. c. u. Wiechmann, l. c.

II. Die Frage der Chlorbindung im Plasma.

Was die Frage der Chlorbindung im Serum anlangt, so ist die Meinung der meisten Autoren, daß der größte Teil des Chlors im Serum sicherlich nicht gebunden ist[1]). Das Verhältnis zwischen der kleinen, nichtdiffusiblen Cl-Menge und der diffusiblen Cl-Menge soll aber abhängig sein von der Wasserstoffionenkonzentration des Serums[2]).

Eine Möglichkeit, die man früher nicht näher berücksichtigt hat, ist in den letzten Jahren hervorgehoben worden, und zwar diese, daß im Serum fast alles Chlor frei vorhanden ist, daß aber im Plasma ein belangreicher Teil chemisch gebunden ist. Als eine solche im Plasma bestehende Cl-Verbindung wurde von Falta und Richter-Quittner eine Chlor-Fibrinogenverbindung angenommen[3]). Diese Annahme beruhte hauptsächlich auf einen Unterschied, der bei der Cl-Bestimmung im Plasma gefunden wurde, je nachdem diese nach einer Veraschungs- oder nach einer Fällungsmethode ausgeführt worden war. Im Serum wurde ein solcher Unterschied nicht gefunden. Von ihrer ursprünglichen Meinung, daß wir es hier mit einer sehr stabilen und salzreichen Verbindung zu tun haben, sind die genannten Autoren in einer in neuester Zeit erschienenen Arbeit abgekommen[4]). Die von ihnen wie auch von Rusznyák[5]) beobachtete Differenz im Plasma-Cl bei Verwendung von verschiedenen Methoden wird jetzt als durch den Dispersitätsgrad der untersuchten Flüssigkeit bedingt angesehen. Rusznyák will die Differenz zwischen Plasma und Serum auf den größeren Eiweißgehalt des Plasmas zurückführen und stützt sich dabei auf Ultrafiltrationsversuche, die aber von Falta und Richter-Quittner nicht bestätigt worden sind. Die Möglichkeit des Vorhandenseins einer Fibrinogen-Cl-Verbindung wird von den Autoren noch offengehalten.

Es ist von vornherein wahrscheinlich, daß auf eine eventuell bestehende Verbindung von Fibrinogen und Chlor im Blute verschiedene Faktoren Einfluß haben werden. Das darf für die CO_2-Spannung z. B. aus den von Hamburger[6]) mit Serum gemachten Ultrafiltrationsversuchen konkludiert werden. In Experimenten in vitro ist diesen teils nicht gut zu beherrschenden Faktoren nicht immer genügend Rechnung getragen. Auch arbeitet man dann immer mit Hirudin- oder Oxalatplasma; die kolloidchemischen Eigenschaften des Fibrogens in diesem Plasma können ganz verschieden sein von denen im natürlichen Plasma.

---

[1]) Höber, Physik. Chemie d. Zelle u. Gew. 4. Aufl. S. 175. 1914.

[2]) Rona und György, diese Zeitschr. **56**, 416. 1913. — Hamburger, diese Zeitschr. **86**, 309. 1918.

[3]) Falta und Richter-Quittner, diese Zeitschr. **91**, 381. 1918.

[4]) Falta und Richter-Quittner, diese Zeitschr. **114**, 310. 1921.

[5]) Rusznyák, diese Zeitschr. **110**, 60. 1921.

[6]) l. c.

Versuche in vivo zur Lösung der vorliegenden Frage waren deshalb m. E. gerechtfertigt.

Als ein physiologisches Ultrafiltrat oder besser Dialysat von dem natürlichen Blutplasma meinen wir auf Grund von rezenten Untersuchungen das Augenkammerwasser betrachten zu dürfen[1]). Zwar hat man schon oft seine Zusammensetzung mit dem des Blutplasmas verglichen, das letztere war dann aber niemals unter den früher erwähnten Kautelen erhalten worden. Für die Beurteilung des Bestehens einer Fibrinogen-Cl-Verbindung schien uns eine Vergleichung des Kammerwassers und mit dem mit bestimmten Vorsorgen erhaltenen Blutplasma sehr geeignet. Das Kammerwasser enthält nur winzige Mengen Eiweiß, aber keine Spur Fibrinogen. Die Vergleichung mit dem Blutplasma kann entweder geschehen durch Gewinnung von Plasma direkt aus dem Blute, oder man kann das primäre fibrinogenfreie Kammerwasser vergleichen mit dem nach einer ersten resp. zweiten Punktion der Augenkammer regenerierten sekundären resp. tertiären Kammerwasser. Das neugebildete Kammerwasser ist wenigstens beim Kaninchen fibrinogenreich und nähert sich in Zusammensetzung dem echten Blutplasma, wie nach den rezenten experimentellen Untersuchungen von Seidel[2]) begreiflich ist.

Wir bemerken nebenbei, daß man unseres Erachtens Kammerwasser durch die Veränderungen, die darin in Eiweißmenge und Eiweißarten nach einer Punktion der Augenkammer auftreten, gut benutzen kann, um die Eiweißhypothesen von Herzfeld und Klinger[3]) und die Erklärungen, die sie mit diesen Hypothesen von verschiedenen biochemischen Problemen gegeben haben[4]), zu untersuchen.

Tabelle IV[5]).

Vergleichung von Cl-Gehalt (ausgedrückt in % NaCl) und Refraktion von primärem und sekundärem Kammerwasser.

	Cl-Gehalt		Refraktion	
	prim. K.-W.	sek. K.-W.	prim. K.-W.	sek. K.-W.
1	0,6494	0,6230	1,3350	1,3449
2	0,6319	0,6116	1,3339	1,3431
3	0,6650	0,6560	1,3341	1,3412
4	0,5872	0,5499	1,3341	1,3431
5	0,6603	0,6467	1,3339	1,3438

Wie aus diesen Versuchen hervorgeht, enthielt das sekundäre Kammerwasser immer weniger Chlor als das primäre. Die zweite Punk-

[1]) de Haan und v. Creveld, neulich in dieser Zeitschr. erschienen. — Seidel, Graefes Arch. f. Ophthalmol. **104**, 162. 1921.

[2]) l. c.

[3]) Herzfeld und Klinger, diese Zeitschr. **82**, 228. 1917 u. f.

[4]) Siehe auch Starlinger, diese Zeitschr. **114**, 129. 1921.

[5]) Für die Methodik der Punktion siehe de Haan und v. Creveld l. c.

tion geschah, sobald die Vorderkammer des Auges sich wieder angefüllt hatte, d. h. meistens nach einigen Minuten. Der Unterschied im Cl-Gehalt von primärem und sekundärem Kammerwasser wurde gegen Erwartung in unseren Fällen ziemlich konstant gefunden. Die Schwankungen im NaCl-Gehalt von Plasma durch Fütterung usw. scheinen sich also schnell mit dem Kammerwasser auszugleichen.

Der gesamte Eiweißgehalt des sekundären Kammerwassers war in unseren Fällen 2—5%, wie aus der Refraktion berechnet werden kann. Mit Berücksichtigung dieses Gehaltes wird man dennoch sagen müssen, daß das Auftreten von Fibrinogen im Kammerwasser nicht zusammengegangen ist mit einer Vermehrung des Cl-Gehaltes.

Man könnte einwenden, daß die Vergleichung nur mit dem Blutplasma geschehen darf. Deshalb geben wir hier die Werte für den Cl-Gehalt vom Kammerwasser in den Fällen, wo wir früher arterielles und venöses Blut untersucht haben (Tabelle I).

Tabelle V.

Blutplasma		Prim. Kammerwasser
arter.	venös	
0,649	0,614	0,6650
0,608	0,582	0,6344
—	0,544	0,5872
0,594	—	0,6314

Man wird hier bedenken, daß das Kammerwasser eher als ein Ultrafiltrat (Dialysat) von dem arteriellen als von dem venösen Blute zu betrachten ist. Immerhin geben auch diese Bestimmungen keinerlei Anhaltspunkte für das Bestehen einer Fibrinogen-Cl-Verbindung im Blute. Im besten Falle kann es sich handeln um eine so kleine mit dem Fibrinogen verbundene Chlormenge als mit der hier verwendeten Methode nicht bestimmt werden kann. Ob es möglich sein wird, eine so kleine Menge dann noch durch vergleichende Bestimmung der Chlorionenkonzentration im Plasma und Ultrafiltrat (Kammerwasser) zu entdecken, scheint uns auf Grund der Erfahrung anderer Untersucher bei derartigen Problemen fraglich[1]).

Eine nähere Erklärung wird noch die Tatsache brauchen, daß wir in vivo im Plasma mit der befolgten Methodik kein gebundenes Chlor nachweisen konnten, daß aber im Serum bei Einwirkung von CO_2 unter einem Druck, der innerhalb der physiologischen Grenzen bleibt, deutlich Cl an das Serumeiweiß gebunden gefunden wurde[2]).

---

[1]) Siehe hierzu z. B. Brown und Hill, Journ. of physiol. **54**, CXXI. 1921. — Manabe und Matula, diese Zeitschr. **52**, 369. 1913.

[2]) Hamburger, l. c. — Rona und György, l. c.

Zusammenfassung.

Es wurde auseinandergesetzt, weshalb die neueren Arbeiten über die Chlorpermeabilität der Blutkörperchen (Falta und Richter-Quittner, Straub und Meier u. a.) keinen Aufschluß geben über die Verhältnisse im strömenden Blute. Durch direkte Bestimmungen wurde das Bestehen einer solchen Permeabilität in vivo nachgewiesen. Weiter wurde hingewiesen auf eine Konsequenz, die aus den erhaltenen Resultaten für die Methodik der klinischen Chlorbestimmungen im Blute folgen muß.

Die in der letzten Zeit umstrittene Frage von dem Bestehen einer Chlorfibrinogenverbindung im Plasma wurde durch vergleichende Bestimmungen im Plasma und dem als ein Ultrafiltrat (Dialysat) des Blutes sich verhaltendes Augenkammerwasser, im negativen Sinne entscheiden.

Berichtigung

zu der Arbeit E. Freudenberg und P. György: Über Kalkbildung durch tierische Gewebe, diese Zeitschrift 118. 1921.

(Eingegangen am 6. Oktober 1921.)

Seite 54 wird zweimal der Ausdruck Phosphatgemisch $\frac{m}{1}$-Lösung von saurem Phosphat gebraucht, welche durch Phosphorsäurezusatz auf p_H 3,0 gebracht war. Da das Wort Phosphatgemisch für Gemische von primärem und sekundärem Phosphat vorbehalten bleiben muß, so wird die unzweckmäßige Anwendung dieses Ausdruckes hiermit richtig gestellt.

Autorenverzeichnis.

Druck der Spamerschen Buchdruckerei in Leipzig





